



Ana Isabel Neves Nogueira

Licenciada em Biotecnologia

Avaliação do desenvolvimento de neurónios em materiais nanoestruturados destinados a uma conduta neural

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar,
FCT-UNL

Júri

Presidente: Prof. Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro, FCT-
UNL

Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Nobre Martins Aguiar de Oli-
veira Ricardo, FCT-UNL

Vogal: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques, FCT-UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2016

Avaliação do desenvolvimento de neurónios em materiais nanoestruturados destinados a uma conduta neural

Copyright © Ana Isabel Neves Nogueira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradeço desde já à Professora Célia Henriques pela oportunidade de realizar este projeto. Pela sua orientação, motivação e auxílio nas dificuldades ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Jorge Silva por toda ajuda prestada no laboratório, disponibilidade e partilha de conhecimentos.

Ao CENIMAT e ao laboratório de Criogenia por disponibilizarem a utilização dos seus equipamentos.

Às minhas colegas e amigas de laboratório, Tânia Vieira, Ana Fradinho, Carolina Rufino, Ana Pepe e Susana Caixado, por todo o companheirismo, apoio, entreaajuda, animação e boa disposição proporcionada ao longo desta etapa.

Às minhas amigas Sofia Silva, Sara Gomes e Ana Gameiro que me acompanharam ao longo deste percurso.

Aos meus amigos de infância, especialmente à Patrícia Carvalho e à Rita Modesto por todo o apoio, cumplicidade e momentos únicos vivenciados.

Ao Ivan Oliveira por toda a paciência, amizade, carinho e companheirismo demonstrado.

Por último, um agradecimento muito especial à minha família, principalmente aos meus pais, por todo o apoio e amor incondicional demonstrado em todos os momentos da minha vida. O que sou hoje, lhes devo a eles.

Resumo

Para promover a regeneração da espinal medula lesada, a Engenharia de Tecidos propõe a utilização de condutas neurais. Estas devem estimular o crescimento orientado de axónios e poderão também servir de suporte para o transplante de células e como veículo para a entrega de moléculas bioativas.

Na perspetiva de poderem vir a integrar uma conduta neural, foram produzidas matrizes de fibras submicrométricas pela técnica de electrofiação. Para a sua produção foram usados diversos materiais: gelatina de diferentes origens (de porco, de bovino e de peixe) e quitosano (ambos polímeros de origem natural) e policaprolactona (polímero de origem sintética). Estas matrizes foram produzidas com dois tipos de topografias - fibras depositadas sem orientação preferencial (desalinhadas) e paralelamente alinhadas (fibras alinhadas).

Após o processo produtivo, as matrizes de gelatina foram sujeitas a dois tipos de processos de reticulação: um físico (tratamento desidrotérmico-DHT) e outro químico (exposição a vapores de glutaraldeído-GTA). A eficiência destes processos foi analisada por testes de perda de massa das matrizes por imersão em água e ensaios de ninidrina.

Os diferentes tipos de matrizes foram avaliados no que diz respeito às suas propriedades mecânicas, através dos ensaios de tração, e quanto à composição química, pela análise de espectroscopia de infravermelho de transformada de *Fourier* (FTIR).

De forma a avaliar respostas celulares às matrizes produzidas, realizaram-se testes *in vitro* com duas linhas de células humanas: HFFF2 (fibroblastos) e SH-SY5Y (células provenientes de um neuroblastoma). Nos testes com os fibroblastos foram avaliadas taxas de adesão e proliferação celulares nas diferentes matrizes. Estes testes revelaram efeitos citotóxicos associados às gelatinas quando reticuladas por GTA e, uma fraca adesão ao quitosano.

Foram estabelecidos protocolos de diferenciação da linha celular SH-SY5Y, com o intuito de avaliar o desenvolvimento morfológico (extensão dos prolongamentos) das células diferenciadas semeadas em diferentes substratos. Nesta fase foi possível visualizar o desenvolvimento dos prolongamentos na direção do alinhamento das fibras, comprovando que a topografia auxilia a regeneração axonal guiada.

Palavras-chave: Electrofiação; Gelatinas; Quitosano; Policaprolactona; Diferenciação celular; Regeneração neuronal.

Abstract

Neuronal Guidance Conduits (NGC) can be aimed at supporting spinal cord repair, which can contribute to the regeneration of endogenous cells, support cell transplantation and act as a delivery vehicle for bioactive molecules.

The aim of this study was to develop matrices of sub-micron fibers which could be incorporated in NGC model. These matrices were produced using natural polymers as chitosan (CS) and gelatin – derived from three different sources: porcine (GP), bovine (GB) and fish (GPx) - and polycaprolactone (PCL) which is a synthetic polymer. Two matrix topographies, aligned and randomly aligned fibers, were produced by electrospinning using the mentioned polymers.

After production, gelatin matrices were subjected to different crosslinking treatments: a physical (DHT treatment) and a chemical (exposure to glutaraldehyde vapour - GTA) method. Given its divergent constitution of amino acids, results showed different degrees of crosslinking analyzed by mass loss tests and ninhydrin assays. Subsequently, mechanical properties and chemical composition were assessed by transform infrared spectroscopy Fourier analysis (FTIR).

In vitro tests were conducted with two cell lines, HFFF2 (fibroblast cell line) and SH-SY5Y (neuroblastoma cell line) in order to evaluate the biological response to the developed matrices. Results revealed cytotoxicity caused by unreacted groups of aldehyde, when crosslinking with GTA. Lastly, differentiation protocols were established with the SH-SY5Y cell line to assess neural adhesion to substrates, considering mainly matrices crosslinked by DHT. Results showed development of neurites along the alignment axis of the fiber matrices, confirming that this topography can support guided axonal regeneration.

Keywords: Electrospinning; Gelatin; Chitosan; Polycaprolactone; Cell differentiation; Neural regeneration

Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract	ix
Índice de Tabelas.....	xiii
Índice de Figuras	xv
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xxi
Apresentação e Enquadramento do Trabalho.....	1
1 Introdução	2
1.1 Sistema nervoso.....	2
1.1.1 Células neurais	2
1.1.2 Espinal medula	5
1.2 Resposta fisiológica a lesões	6
1.2.1 Estratégias para tratamento de lesões	9
2 Materiais e métodos	14
2.1 Materiais.....	14
2.1.1 Gelatina	15
2.1.2 Quitosano	16
2.1.3 Póli(óxido de etileno)	17
2.1.4 Policaprolactona	18
2.2 Electrofiação.....	18
2.2.1 Parâmetros de produção	20
2.2.2 Propriedades da solução	20
2.2.3 Parâmetros ambientais.....	21
2.3 Preparação das matrizes de fibras.....	21
2.3.1 Soluções poliméricas.....	22
2.3.2 Electrofiação das soluções.....	23
2.3.3 Reticulação da gelatina.....	26
2.3.4 Caraterização das matrizes	28
2.4 Testes in vitro- Culturas celulares	34

2.4.1	Avaliação da viabilidade celular	34
2.4.2	Avaliação da morfologia celular	35
2.4.3	Culturas celulares com HFFF2.....	35
2.4.4	Cultura celulares com SH-SY5Y	36
3	Apresentação e discussão de Resultados.....	39
3.1	Produção de matrizes poliméricas	39
3.1.1	Matrizes de PCL.....	39
3.1.2	Matrizes de CS	42
3.1.3	Matrizes de gelatina de peixe	44
3.1.4	Matrizes de gelatina de porco.....	45
3.1.5	Matrizes de gelatina de bovino.....	47
3.1.6	Resumo dos parâmetros de produção.....	49
3.2	Caraterização das matrizes	50
3.2.1	Morfologia.....	50
3.2.2	Diâmetro.....	54
3.2.3	Alinhamento	56
3.2.4	Perda de massa	58
3.2.5	Ensaio de ninidrina	60
3.2.6	Ensaio de tração	63
3.2.7	ATR-FTIR.....	65
3.3	Testes in vitro	68
3.3.1	Culturas com a linha celular HFFF2	69
3.3.2	Culturas com a linha celular SH-SY5Y.....	78
4	Conclusões e perspectivas futuras	83
	Referências	85
	Anexos.....	91

Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Eventos biológicos desencadeados durante a lesão secundária na espinal medula....	8
Tabela 2.1- Materiais e solventes utilizados para preparação de soluções de electrofiação.	22
Tabela 2.2-Soluções poliméricas para electrofiação.	23
Tabela 2.3-Condições de diferenciação das células SH-SY5Y ao longo do tempo.	37
Tabela 3.1-Pâmetros de electrofiação testados para a solução 8% de PCL em clorofórmio. ..	40
Tabela 3.2- Imagens de microscopia ótica das fibras produzidas a partir da solução de 10% de PCL em clorofórmio, para vários conjuntos de parâmetros de produção.	40
Tabela 3.3-Influência da velocidade de rotação do coletor cilíndrico no alinhamento das fibras de PCL.	41
Tabela 3.4- Imagens de microscopia ótica das fibras produzidas a partir da solução de 1,8% CS e 0,4% de PEO para vários conjuntos de parâmetros de produção.	42
Tabela 3.5- Resumo dos parâmetros de produção das matrizes poliméricas de fibras alinhadas e desalinhadas.	49
Tabela 3.6- Processos de reticulação realizados nos materiais.	50
Tabela 3.7- Imagens de SEM das matrizes de fibras.	51
Tabela 3.8- Morfologias das fibras das matrizes produzidas após os processos de reticulação..	52
Tabela 3.9-Diâmetros médios (d) das fibras alinhadas e desalinhadas ($n=50$) dos diferentes materiais (não reticulados) e o respetivo desvio-padrão da média (σ).	55
Tabela 3.10- Retas de calibração para cada gelatina reagida com ninidrina.	61
Tabela 3.11- Grau de reticulação de cada gelatina (%), resultante dos vários processos de reticulação aplicados, avaliado pela média ($n=3$) da fração de aminas reagidas durante o processo, com o desvio padrão da média.	62
Tabela 3.12- Médias do módulo de <i>Young</i> das matrizes de PCL, CS, GPx, GP e GB reticuladas por DHT e GTA.	63
Tabela 3.13-Principais bandas de absorção do CS no infravermelho.	65
Tabela 3.14-Principais bandas de absorção da gelatina do infravermelho.	65

Índice de Figuras

Figura 1.1- Neuroglia do SNC. Adaptado de [1].	4
Figura 1.2- Anatomia da espinal medula. Adaptado de [2].	5
Figura 1.3- Secção transversal da espinal medula. Adaptado de [1].	6
Figura 1.4- Eventos fisiopatológicos que ocorrem após lesão na espinal medula. Adaptado de [3].	7
Figura 1.5- Imagens da topologia dos <i>scaffolds</i> de CS, obtidas por microscopia eletrónica de varrimento. (a) Filme de CS; (b) matriz porosa de CS; (c) Corte transversal da conduta de CS; (d) corte longitudinal da conduta de CS. Escala da barra: 100 µm. Adaptado de [6].	10
Figura 1.6- Imagens das NSCs diferenciadas nos scaffolds de CS, ao 5º dia de cultura na presença de 10% FBS. Estas imagens foram obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (a-c) e imunofluorescência (d-f). (a,d) NSCs diferenciadas nos filmes de CS; (b, e) NSCs diferenciadas nas matrizes porosas de CS; (c,f) NSCs diferenciadas nas condutas multimicrotubulares de CS. Barra da escala: (a) e (c)-10 µm; (d-f)- 20 µm; (b)- 100 µm. As setas indicam as células. Adaptado de [6].	11
Figura 2.1- Estrutura química da quitina e do CS, com x unidades de N-acetil-glucosamina e y unidades de N-glucosamina. Adaptado de [51].	16
Figura 2.2- Estrutura química da PCL. Adaptado de [57].	18
Figura 2.3- Esquema de electrofiação. Adaptado de [61].	19
Figura 2.4- Montagem do sistema de electrofiação utilizado para testes iniciais. O sistema compreende uma seringa BIBraun Inject® de 5mL e, diâmetro interno de 12,48 mm; uma bomba injetora Chemix Fusion 100; uma fonte de alta tensão Iseg T1CP 300 304 p.	24
Figura 2.5- Montagem do sistema de electrofiação utilizado para obtenção de fibras desalinhas. O sistema difere da figura anterior no coletor usado- coletor cilíndrico rotatório a baixa velocidade.	25
Figura 2.6- Montagem do sistema de electrofiação utilizado para obtenção de fibras alinhadas, visto de duas diferentes perspetivas. O sistema compreende uma seringa BIBraun Inject® de 5mL e 12,48 mm de diâmetro interno; uma bomba injetora New Era Pump Systems; uma fonte de alta tensão construída no laboratório (GREAT); um coletor cilíndrico que pode atingir altas velocidades de rotação.	25
Figura 2.7- Mecanismo de reticulação da gelatina por GTA. Adaptado de [5].	27

Figura 2.8- Reações da ninidrina com um aminoácido, originando a formação de púrpura de <i>Ruhemann</i> . Adaptado de [4].	30
Figura 2.9- Curva de tensão versus deformação típica de um material polimérico.	32
Figura 2.10- Equipamento usado nos testes de tração: visão global da montagem.....	32
Figura 2.11- Ensaio de tração onde se observa a matriz a ser tracionada presa pelas garras.	33
Figura 3.1- Imagens de microscopia ótica das fibras de CS produzidas no coletor rotatório, à esquerda a 1200 rpm e à direita a 4000 rpm. Barra da escala: 20 μ m.	43
Figura 3.2- Imagens de microscopia ótica das fibras desalinhadas de GPx, produzidas a partir de uma solução de 25% numa solução aquosa de AAC a 90%, com $V=15$ kV, $\phi=0,2$ ml/h e $d=20$ cm; à esquerda ampliação 100 x; à direita ampliação 500 x; Barra de escala: 20 μ m.	44
Figura 3.3- Imagem de microscopia ótica das fibras de GPx alinhadas a 4000 rpm, obtidas com uma ampliação de 100 x. Barra da escala: 20 μ m.	45
Figura 3.4- Imagem de microscopia ótica das fibras desalinhadas de GP produzidas com $V = 15$ kV,	46
Figura 3.5- Imagens de microscopia ótica das fibras de GP obtidas no coletor cilíndrico rotatório com os parâmetros $V = 14$ kV; $\phi = 0,7$ ml/h e $d = 25$ cm a diferentes velocidades de rotação: (a) 700 rpm; (b) 1200 rpm; (c) 2000 rpm; (d) 4000 rpm.	46
Figura 3.6- Imagens de microscopia ótica das fibras desalinhadas de GB, produzidas a partir da concentração de 20% em solução aquosa de AAC a 90% e, com os parâmetros de produção fixos em: $V = 17$ kV, $\phi = 0,7$ ml/h e $d = 25$ cm; à esquerda- Ampliação 100 x, barra de escala 100 μ m; à direita- 500 x, barra de escala 20 μ m.	48
Figura 3.7- Imagens de microscopia ótica das fibras alinhadas de GB produzidas a partir da solução a 20% em solução aquosa de AAC a 90% v/v, com os parâmetros de produção fixos em $V=14$ kV, $\phi=0,7$ ml/h e $d = 25$ cm. (a) Ampliação 100 x, barra de escala 100 μ m; (b) 500 x, Barra de escala=20 μ m.....	48
Figura 3.8- Imagem de SEM da matriz alinhada de PCL produzida a 1000 rpm (a) e, o respetivo histograma com curva de normalização (b), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.....	56
Figura 3.9- Imagem de SEM da matriz alinhada de CS produzida a 4000 rpm (c) e, o respetivo histograma com curva de normalização (d), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.....	57
Figura 3.10- Imagem de SEM da matriz alinhada de GPx produzida a 4000 rpm (e) e, o respetivo histograma com curva de normalização (f), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.	57

Figura 3.11- Imagem de SEM da matriz alinhada de GP produzida a 4000 rpm (g) e, o respetivo histograma com curva de normalização (h), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.....	57
Figura 3.12- Imagem de SEM da matriz alinhada de GB produzida a 4000 rpm (i) e, o respetivo histograma com curva de normalização (j), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.....	58
Figura 3.13- Perda de massa (%) das diferentes gelatinas, reticuladas por DHT e por exposição a vapor de uma solução aquosa de GTA a 50% 2, 4 e 6h, quando imersas em água à temperatura ambiente.	59
Figura 3.14- Perda de massa (%) em água a 37°C das diferentes gelatinas reticuladas por DHT e GTA 5% e 50 %.	60
Figura 3.15- Retas de correlação entre a concentração de soluções de gelatina e a absorvância a 570 nm, lida após reação da ninidrina com grupos amina presentes nessas soluções. Os valores para cada concentração correspondem à média de réplicas ($n=3$) e a barra de incerteza ao desvio padrão da média.	61
Figura 3.16- Curva de tração de uma amostra de PCL, representativa do conjunto de réplicas testadas, obtida a uma velocidade de 2 mm/min.	64
Figura 3.17- Curvas de tração representativas do comportamento das matrizes de CS e gelatinas humedecidas, obtidas a uma velocidade de 1 mm/ min.....	64
Figura 3.18- Espectro de FTIR do CS não reticulado e reticulado por DHT 72h e 144h a 140°C.	66
Figura 3.19- Espectro de FTIR das diferentes gelatinas não reticuladas	67
Figura 3.20- Espectros FTIR da gelatina de peixe (GPx), não reticulada e reticulada por DHT 72h, e por exposição ao vapor de soluções aquosas de GTA 50% 4 h e 5% 4h e 6h.	67
Figura 3.21- Espectros FTIR da gelatina de porco (GP), não reticulada e reticulada por DHT 72h, e por exposição ao vapor de soluções aquosas de GTA 50% 4 h e 5% 4h.....	68
Figura 3.22- Espectros FTIR da gelatina de bovino (GB), não reticulada e reticulada por DHT 72h, e por exposição ao vapor de soluções aquosas de GTA 50% 4 h e 5% 4h.....	68
Figura 3.23- Representação da viabilidade das células HFFF2 às 24h, nas matrizes de CS, PCL e gelatinas reticuladas por DHT.	69
Figura 3.24- Representação da viabilidade das células HFFF2 semeadas em CS, PCL e gelatinas reticuladas por DHT, do 1º ao 7º dia de cultura (cultura 1).....	70
Figura 3.25- Representação da viabilidade das células HFFF2 semeadas em CS, PCL e gelatinas reticuladas por DHT, do 1º ao 11º dia (Cultura 2).....	71

Figura 3.26- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas nas matrizes de GPx (à esquerda) e GP (à direita), ao 11º dia de cultura.	72
Figura 3.27- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas nas matrizes de GB (à esquerda) e CS (à direita), ao 11º dia de cultura.....	72
Figura 3.28- Imagem de fluorescência das células HFFF2, semeadas na matriz de PCL, ao 11º dia de cultura.	72
Figura 3.29- Representação da viabilidade das células HFFF2 semeadas em CS, CS reticulada por DHT 72 h e 144 h, do 1º ao 9º dia (Cultura 3).	73
Figura 3.30- Representação da viabilidade das células HFFF2 nas matrizes de gelatinas, reticuladas por DHT e por exposição ao vapor de uma solução aquosa de GTA 50% durante 4h, do 1º ao 11º dia (Cultura 4).	74
Figura 3.31- Representação da viabilidade celular das células HFFF2 semeadas nas matrizes de gelatinas reticuladas por GTA 50% 4h, tratadas com soluções de glicina (Cultura 5).....	75
Figura 3.32- Representação da viabilidade das células HFFF2, semeadas nas matrizes de gelatinas reticuladas com GTA 5 e 50%, 4 e 6h (Cultura 6).	76
Figura 3.33- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas nas matrizes de GPx GTA 5% 4h (à esquerda) e GTA 5% 6h (à direita), ao 3º dia de cultura.....	77
Figura 3.34- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas na matriz de GP GTA 50% 4h (à esquerda) e GB GTA 5% 4h (à direita), ao 3º dia de cultura.	77
Figura 3.35- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas na matriz de GB GTA 50% 4h (à esquerda) e CC (à direita), ao 3º dia de cultura.....	77
Figura 3.36- Resultados dos processos de diferenciação das células SH-SY5Y ao 13º dia de cultura. À esquerda representa-se a 1ª condição e à direita a 2ª condição.....	78
Figura 3.37- Resultados do processo de diferenciação das células SH-SY5Y ao 13º dia, na 3ª condição.....	78
Figura 3.38- Imagens de fluorescência das células SH-SY5Y ao 10º dia de cultura. À esquerda está presente a PCL com fibras desalinhadas e à direita a GPx com fibras alinhadas (DHT).	79
Figura 3.39- Imagens de fluorescência das células SH-SY5Y ao 10º dia de cultura. À esquerda está presente o CC e à direita o PCL com fibras alinhadas.	79
Figura 3.40- Imagem de fluorescência das células SH-SY5Y ao 10º dia de cultura. À esquerda está presente a GP com fibras alinhadas (DHT) e à direita a GB com fibras alinhadas (DHT).	80
Figura 3.41- Imagem de fluorescência das células SH-SY5Y ao 10º dia de diferenciação no CS.	80

Figura 3.42- Imagens de fluorescência das células SH-SY5Y ao 20º dia de diferenciação no PCL com fibras alinhadas (à esquerda) e no PCL com fibras desalinhadas (à direita). 81

Lista de Siglas e Abreviaturas

- AAC- Ácido acético glacial
- AR-Ácido retinóico
- ATR-FTIR- *Attenuated total reflection- Fourier transform infrared spectroscopy*
- bFGF-Factor de crescimento básico de fibroblastos
- Clorof- Clorofórmio
- CS- Quitosano (do inglês *chitosan*)
- DHT-Desidrotérmico
- DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- FBS- Soro fetal bovino (do inglês *fetal bovine serum*)
- FDA- *Food and Drug Administration*
- GB-Gelatina de bovino
- GP-Gelatina de Porco
- GPx-Gelatina de Peixe
- GTA-Glutaraldeído
- HFFF2-*Human Caucasian foetal foreskin fibroblast*
- NSCs- Células Estaminais Neurais
- PAN-MA-poli(acrilonitrilo-co-acrilato de metilo)
- PCL- Policaprolactona
- PDS-Polidioxanona
- PEO- Poli(óxido de etileno)
- PGA-Poli(ácido glicol)
- PHB- Poli(3-hidroxiбутirato)
- PLLA-Poli(ácido L-láctico)
- SEM- Microscopia Eletrônica de Varrimento (do inglês *Scanning Electron Microscopy*)
- SIDA- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- SNA- Sistema Nervoso Autônomo
- SNP-Sistema Nervoso Periférico
- SNP-Sistema Nervoso Periférico

Unidades:

- cm- Centímetros
- g- Gramas
- KDa- Quilodaltons
- kg- Quilogramas
- kVs- Quilovoltes
- mg- Miligramas
- ml- Mililitros
- mm- Milímetros
- M-Molar
- nm- Nanometros
- N-Newton
- Pa-Pascal
- rpm- Rotações por minuto
- µl- Microlitros

Apresentação e Enquadramento do Trabalho

É através do sistema nervoso central (SNC) que nos relacionamos com o mundo. A cada estímulo (sons, cores, cheiros) recebido, respondemos de maneira diferente, devido à complexa rede de células nervosas presente no SNC. A espinal medula é parte integrante deste sistema, responsável pela comunicação entre o encéfalo e o resto do corpo. Quando surge uma lesão medular, desencadeia disfunções motoras/ sensoriais cuja recuperação será bastante restrita, devido ao ambiente intrínseco inibitório estabelecido. Existem práticas clínicas que ajudam a prevenir lesões secundárias e a reduzir a dor, tais como as cirurgias ou a administração de fármacos anti-inflamatórios, mas não promovem a reparação do tecido lesado.

Neste sentido, surge a Engenharia de tecidos que se debruça no desenvolvimento de substitutos funcionais para tecidos lesados. No caso do SNC uma das estratégias em estudo é a utilização de scaffolds (condutas neurais) de forma a oferecer um ambiente propício ao restabelecimento de ligações neuronais entre as terminações nervosas afetadas pela lesão, aliada às terapias celulares e moleculares. A escolha do biomaterial, a topografia e as suas propriedades físicas/químicas revestem-se de extrema importância para a produção dos scaffolds. Neste estudo, para a produção das matrizes de fibras utilizou-se a técnica de electrofiação. Essas matrizes provêm de diversas origens (materiais naturais e sintéticos). Nos materiais naturais inclui-se o CS, a GPx, GP, e GB; como material sintético utilizou-se a PCL. Após a produção das matrizes de gelatina, ambas foram submetidas a processos de reticulação (químicos-GTA; físicos-DHT), de modo a aumentar o número de ligações covalentes estabelecidas entre as cadeias poliméricas e assim evitar a sua dissolução.

Todas as matrizes foram produzidas sem orientação preferencial das fibras e com orientação alinhada. De modo a investigar vários tipos de respostas celulares a estes substratos, utilizou-se dois tipos de modelos células (HFFF2- células de fibroblastos; SH-SY5Y-células tipo neuronais). A utilização das HFFF2 teve por base a avaliação da sua adesão, proliferação e respetiva morfologia. As SH-SY5Y foram utilizadas para o estudo de diferenciação celular, ao avaliar a sua morfologia e neurites desenvolvidas.

1 Introdução

A regeneração das lesões do SNC apresenta desafios únicos para os quais a Engenharia de Tecidos procura soluções. Na sua origem está a resposta fisiológica do SNC às lesões.

1.1 Sistema nervoso

Com uma massa de 2 kg, cerca de 3% do peso total corporal, o sistema nervoso é um dos mais pequenos, mas também um dos mais complexos, admiráveis e surpreendentes sistemas do corpo humano. Assenta na complexidade de uma rede transmissora intrincada, altamente organizada, de biliões de neurónios e num número ainda superior de células gliais [1, 7].

Este divide-se em duas partes principais –SNC e o Sistema Nervoso Periférico (SNP). Ambos têm como função receber/interpretar estímulos internos e externos, processá-los e transmiti-los a diversas zonas do corpo.

O SNC inclui o cérebro e a espinal medula. O SNP é constituído pelos nervos espinais, nervos cranianos e os seus gânglios [8]. Estes nervos são compostos principalmente por feixes de fibras nervosas ou axónios, que conduzem a informação para o SNC [9].

A fisiologia do sistema nervoso é assegurada por um conjunto de células específicas designadas por células nervosas ou células neurais.

1.1.1 Células neurais

O sistema nervoso compreende dois tipos principais de células neurais: os neurónios e as células gliais.

- **Neurónios**

Os neurónios são células excitáveis, especializadas na receção de estímulos e condução de impulsos nervosos [8]. A sua resposta a estímulos envolve o deslocamento de iões (sódio ou potássio) entre o fluido intersticial e o interior do neurónio conduzindo a alterações do potencial

da membrana plasmática – potenciais de ação – responsáveis pela comunicação no sistema nervoso [1].

As células gliais têm como principal função assistir os neurónios, mantendo a homeostase do fluido intersticial que os rodeia [1].

A partir do corpo celular de um neurónio estendem-se curtas ramificações – as dendrites – onde se localizam recetores que se ligam a neurotransmissores libertados por células vizinhas. A receção destas mensagens químicas promove a estimulação eletroquímica que se propaga pela dendrite até ao corpo celular. Os potenciais de ação resultam destes eventos. O citoplasma das dendrites contém ainda densas redes de microtúbulos, bem como extensões do retículo endoplasmático [1, 8, 9].

O axónio é uma neurite longa, fina e tubular que se pode estender por mais de 1 metro num humano. A sua função é propagar impulsos nervosos (desencadeados pelos potenciais de ação) para outro neurónio, fibra muscular ou célula glandular. Muitas vezes as dendrites e os axónios são apelidados de fibras nervosas [8].

Alguns axónios têm um isolamento elétrico especial devido a uma bainha de mielina formada por células gliais (células de *Schwan* no SNP e oligodendrócitos no SNC). Num axónio mielinizado a condução dos impulsos é significativamente acelerada [9].

- **Células gliais**

As células gliais ou neuroglia, constituem metade do volume do SNC. Geralmente estas células são menores que os neurónios, cerca de 5-50 vezes mais abundantes e, ao contrário dos neurónios, podem multiplicar-se no sistema nervoso adulto [1].

No SNC as células gliais compreendem astrócitos, oligodendrócitos, microgliócitos e ependimócitos, como representado na Figura 1.1[1].

Os **oligodendrócitos** são frequentemente encontrados ao longo das fibras nervosas mielinizadas ou a circundar corpos celulares nervosos [8]. Como atrás referido, os oligodendrócitos são responsáveis pela formação e manutenção da bainha de mielina que rodeia os axónios do SNC, aumentando a velocidade de condução nervosa [1, 8].

Os **astrócitos** são as células gliais presentes em maior número e possuem uma forma estrelar e as suas principais funções são [1]:

- Suportar os neurónios através dos seus microfilamentos;

- Através da secreção de substâncias químicas, mantêm as características de permeabilidade seletiva das células endoteliais dos capilares no SNC. Criam assim, uma barreira (barreira hemato-encefálica/espinomedular) que impede a passagem de matérias potencialmente perigosas do sangue para o SNC;
- Ajudam a manter o ambiente químico adequado à ocorrência de impulsos nervosos, por exemplo, regulando a concentração de iões K^+ ;
- Servem como canal de passagem de nutrientes entre os capilares sanguíneos e os neurónios;
- Em embriões, suportam a migração de neurónios imaturos;
- Influenciam a formação de sinapses neurais (estruturas que permitem a passagem de sinais entre neurónios).

Os **microgliócitos** são pequenas células, que se encontram dispersas por todo o SNC. Têm a função de fagocitar o tecido nervoso danificado resultante de uma lesão ou de doenças tais como *Alzheimer*, *Parkinson*, Esclerose Múltipla, e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) [1, 8].

Os **ependimócitos** são células de forma cúbica que se dispõem alinhadamente em camada única nas cavidades do cérebro e do canal central da espinhal medula. Possuem microvilosidades e cílios, que contribuem para o fluxo do fluido cefalorraquidiano [1, 8].

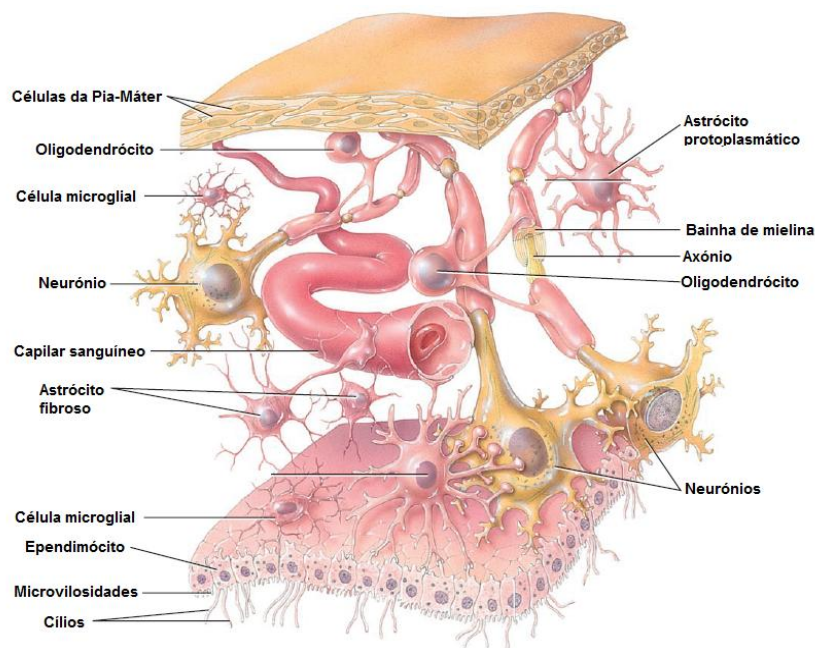


Figura 1.1- Neuroglia do SNC. Adaptado de [1].

1.1.2 Espinal medula

1.1.2.1 Anatomia

A espinal medula faz a interligação entre o encéfalo e o SNP. De forma aproximadamente cilíndrica, estende-se ao longo do canal vertebral até à região lombar inferior, medindo cerca de 45 cm num adulto [8, 10, 11]. De entre os espaços intervertebrais emergem pares de nervos espinais que são nomeados e numerados de acordo com a região e o nível da coluna vertebral, como representado na Figura 1.2: 8 cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sacrais e 1 coccígeo.

Cada nervo espinal está ligado à espinal medula através de duas raízes – a raiz dorsal e a raiz ventral. A raiz dorsal transmite informação sensorial aferente e a raiz ventral transporta sinais motores eferentes. Os nervos espinais servem assim de vias de comunicação com regiões específicas do corpo [1, 11].

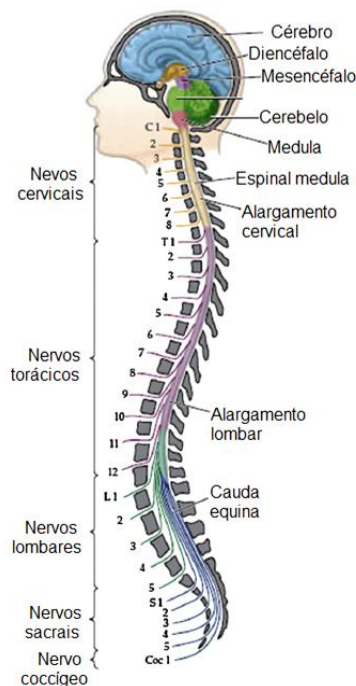


Figura 1.2- Anatomia da espinal medula. Adaptado de [2].

A espinal medula encontra-se protegida por três membranas que a envolvem (as meninges: dura-máter, aracnoide-máter e pia-máter), pelo líquido cefalorraquidiano que a circunda e pela coluna vertebral [1, 8, 11].

Um corte transversal da espinal medula revela a existência de uma substância cinzenta na zona central e uma substância branca na periferia (Figura 1.3). A matéria cinzenta, com forma de borboleta ou H, é composta por: dendrites, corpos celulares de neurónios, axónios não mielinizados e células de glia. Na matéria branca encontram-se feixes de axónios mielinizados, ascendentes ou descendentes, provenientes de neurónios e que viajam longas distâncias estabelecendo o contacto entre os diferentes níveis da coluna vertebral e o cérebro [1, 10].

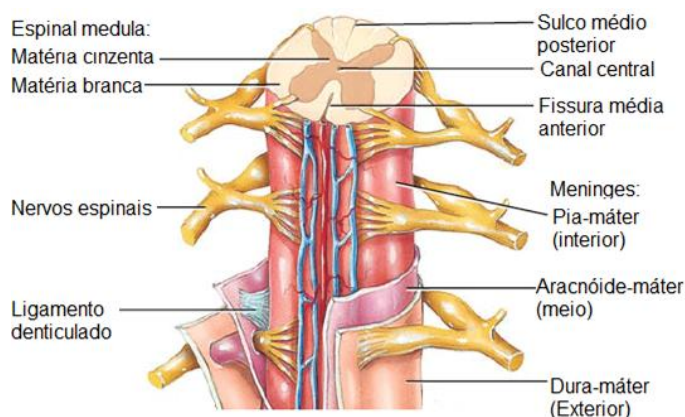


Figura 1.3- Secção transversal da espinal medula. Adaptado de [1].

1.2 Resposta fisiológica a lesões

A lesão medular é uma desordem neurológica, que afeta milhares de pessoas todos os anos. A maioria destas lesões são resultantes de eventos traumáticos, muitas vezes acidentes, que podem levar à compressão e até à rutura do tecido neuronal, mas podem também ter origem em distúrbios, tais como tumores e infeções. A gravidade da lesão depende da sua extensão (percentagem de neurónios afetados) e do nível a que ocorre. Se ao nível da lesão ocorrer rutura completa do tecido neural, todas as funções controladas pelos níveis inferiores da espinal medula são interrompidas, mas, se a rutura for parcial, pode ser assegurada alguma funcionalidade. Nos casos de compressão, as funções comprometidas podem ser recuperadas se a compressão for eliminada antes de ocorrer destruição do tecido [1].

A capacidade regenerativa do SNC é limitada e, em muitos casos, a perda de funções é irreversível, afetando seriamente a qualidade de vida do paciente. Estes factos têm vindo a ser atribuídos à resposta do SNC à lesão, que compreende uma cascata de eventos celulares e mole-

culares, que contribuem para aumentar os danos (lesão secundária) e comprometer a regeneração neuronal [2]. Em resposta à lesão, diversas células e moléculas são convocadas para o local. Mudanças da expressão de genes ocorrem nas células na sequência das quais são codificadas uma série de proteínas envolvidas nos processos de inflamação, neurotransmissão e reparação [12].

A resposta da espinal medula à lesão pode ser dividida em três fases sequenciais: lesão primária ou fase aguda (ocorre minutos após a lesão), lesão secundária (ocorre minutos ou semanas após a lesão), e fase crônica (ocorre meses ou anos após a lesão). A Figura 1.4 ilustra os eventos que ocorrem durante essa resposta [12].

Na “lesão primária” ocorre edema local e pode ocorrer hemorragia, necrose de neurónios ou transecção dos axónios [2, 3].

A “lesão secundária” consiste na cascata de eventos, descritos na Tabela 1.1.

Na fase crônica ocorre a morte de oligodendrócitos que conduz à desmielinização de axónios o que os torna disfuncionais. Devido à segregação de moléculas por parte dos astrócitos reativos e à proliferação das células microgliais, forma-se uma cavidade quística circundada por uma cicatriz glial que constitui uma barreira física e química à regeneração, impossibilitando o restabelecimento de ligações neuronais através do local lesado [2, 3, 10, 11].

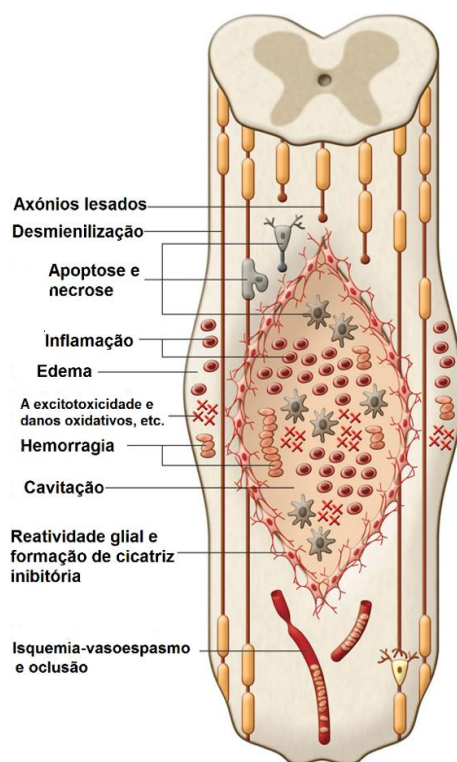


Figura 1.4- Eventos fisiopatológicos que ocorrem após lesão na espinal medula. Adaptado de [3].

Tabela 1.1- Eventos biológicos desencadeados durante a lesão secundária na espinal medula.

Eventos biológicos	Descrição/ Funções
<u>Lesões vasculares</u>	<ul style="list-style-type: none"> Hemorragia- desencadeia-se devido ao choque da lesão; pode causar a morte isquêmica [10]. Vasoespasmós- São induzidos devido à constrição de arteríolas após a lesão, ou à libertação de neurotransmissores vasoconstritores (norepinefrina, serotonina, histamina e prostaglandinas) [10]. Tromboses intravasculares- promovem a isquemia [10]. A microcirculação é induzida por microvasculaturas da espinal medula devido à força mecânica [10]. Estudos feitos em modelos animais relatam que a isquemia não se restringe só ao local da lesão, estende-se numa extensão considerável [10]. Rutura da barreira hemato-encefálica – consequência do aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, devido à rutura das células que formam a barreira hemato-encefálica junto à lesão, levando ao edema vasogénico [10]. <p>Estes eventos levam a edema, necrose e isquemia [2].</p>
<u>Libertação de radicais livres e peroxidação lipídica</u>	<ul style="list-style-type: none"> Causa morte oxidativa dos neurónios da espinal medula; reduz o fluxo sangue que conduz ao edema e resposta inflamatória [2].
<u>Perturbação do equilíbrio iónico (K^+, Na^+, Ca^{2+})</u>	<ul style="list-style-type: none"> Leva à despolarização das membranas celulares, carência de ATPase e ao aumento intracelular de Ca^{2+}. Os neurónios despolarizados tornam-se eletricamente ativos, levando ao aumento da libertação de neurotransmissores [10]. <p>Estes eventos potenciam a morte celular [2].</p>
<u>Apoptose (morte celular programada)</u>	<ul style="list-style-type: none"> Ocorre em populações de neurónios, oligodendrócitos, microglia e astrócitos [2]. As células condensam-se e desfragmentam-se num processo que requer síntese de energia e proteínas [12]. Estes fragmentos provocam inflamação, libertação de neurotransmissores e outros metabolitos que atingem níveis tóxicos que podem afetar ou matar células vizinhas [12]. Em humanos, a morte apoptótica foi observada entre 3h a 8 semanas [10].
<u>Resposta inflamatória</u>	<ul style="list-style-type: none"> Envolve neutrófilos, monócitos e microglia. Neutrófilos-são os primeiros a chegar ao local da lesão, através do sistema circulatório. Removem os invasores microbianos e os restos de tecido, através de moléculas tóxicas e agentes antibacterianos. Libertam também citocinas, proteases e outras células inflamatórias que podem levar à morte neuronal [13]. Monócitos- Entram a partir do sistema circulatório, penetram no tecido da espinal medula e diferenciam-se em macrófagos. Microglia- Segregam citocinas e radicais livres que contribuem para a expansão e o impacto da lesão [12].

1.2.1 Estratégias para tratamento de lesões

1.2.1.1 Prática clínica

As atuais estratégias terapêuticas disponíveis para tratamentos de lesões na espinal medula incluem a administração de neuroprotetores, a cirurgia e a reabilitação física. Estas estratégias conduzem a recuperações limitadas, não existindo ainda nenhum tratamento para os défices neurológicos.

Por vezes, recorre-se à administração de neuroprotetores com o objetivo de reduzir a resposta inflamatória [2, 3, 11, 12]. A metilprednisolona (um corticosteroide) é geralmente o fármaco usado, no entanto a sua utilização é controversa: existem indicações para a necessidade de administração de altas dosagens, até 8 h após a lesão, que conduzem a uma eficácia questionável e a efeitos colaterais indesejados [2, 14].

As cirurgias têm como principal objetivo auxiliar a descompressão medular. Existem fortes evidências de que este procedimento melhora a recuperação funcional e, minimiza as lesões secundárias no SNC. Porém, não existe consenso sobre a necessidade e o momento ideal para recorrer a estas intervenções cirúrgicas [2, 11].

A fisioterapia enquadra-se na área da Medicina de Reabilitação. É um longo caminho no qual os pacientes exercitam os nervos não lesados, de modo a repor alguma da atividade neural perdida [11]. O exercício físico estimula não só a produção de endorfinas, mas também contribui na sobre-regulação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BNDF, do inglês *brain derived neurotrophic factor*), que pode promover a plasticidade sináptica no cérebro e na espinal medula [15]. A estimulação elétrica pode também ajudar na recuperação funcional parcial ou total dos membros paralisados (braços, pernas, tronco, diafragma) [15]. Consiste na estimulação dos músculos através da aplicação de pequenas descargas elétricas leves que levam à sua contração [15].

Para promover a regeneração funcional da espinal medula acredita-se hoje que será necessária uma abordagem que combine várias estratégias. Uma dessas estratégias é a utilização de *scaffolds* como substratos com características físico-químicas adequadas para o restabelecimento das ligações neuronais estabelecidas pelos axónios. A Engenharia de Tecidos tem vindo a investigar esta estratégia considerando também a sua conjugação com terapias celulares e biomoleculares [2, 16].

1.2.1.2 Novas terapias

As **terapias celulares** centram-se no transplante de células e encontram-se em fase de investigação. Experiências efetuadas em modelos animais têm revelado o seu potencial para o tratamento de lesões na espinal medula [2]. São desenhadas para substituir células destruídas ou células que possam contribuir para a regeneração com os fatores de crescimento que expressam [16]. Vários tipos celulares têm sido estudados, incluindo: células de *Schwann*, células neurais estaminais (muitas vezes de origem embrionária), células mesenquimais estaminais, células da mucosa olfativa e células estaminais pluripotentes induzidas [2, 16].

Novas **terapias moleculares** têm também vindo a ser investigadas. Estas focam-se em controlar a resposta inflamatória, no bloqueio de inibidores (como por exemplo a proteína Nogo - *Neurite outgrowth inhibitor*) e na administração de fatores de crescimento [2].

Em **Engenharia de Tecidos** recorre-se à utilização de *scaffolds* para suportar a regeneração de tecidos lesados. A utilização de *scaffolds* (condutas neurais) pode promover a regeneração de células que permaneçam viáveis nesses tecidos e pode também ser combinada com terapias celulares e moleculares, suportando o transplante de células e funcionando como uma plataforma de fornecimento de moléculas bioativas. A escolha do biomaterial e a topografia dos *scaffolds* são fulcrais para a proliferação celular [11, 17].

Num estudo realizado por Wang, G., *et al.*, 2010 avaliou-se a capacidade de proliferação e diferenciação das células neurais estaminais primárias (NSCs do inglês *neural stem cells*) em *scaffolds* de quitosano (CS) com diferentes estruturas, como apresentado na Figura 1.5 [6].

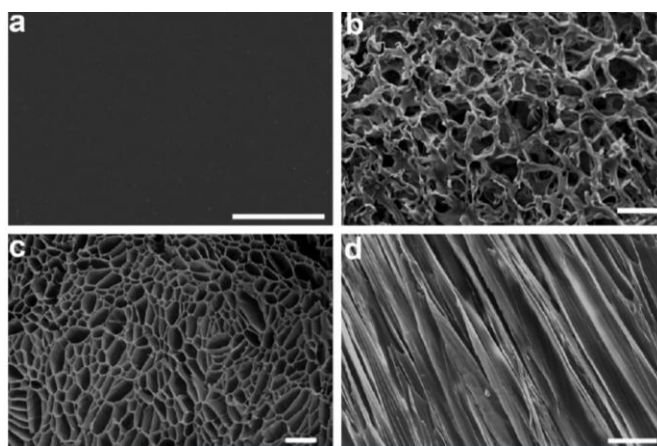


Figura 1.5- Imagens da topologia dos *scaffolds* de CS, obtidas por microscopia eletrónica de varrimento. (a) Filme de CS; (b) matriz porosa de CS; (c) Corte transversal da conduta de CS; (d) corte longitudinal da conduta de CS. Escala da barra: 100 μ m. Adaptado de [6].

Quando semeadas em 10% de soro fetal bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*) e nos filmes, a maioria das NSCs diferenciam-se em astrócitos (Figura 1.6). Nas matrizes porosas ocorreu alguma diferenciação em neurónios, verificando-se um aumento significativo da diferenciação neuronal nas condutas multimicrotubulares. Por outro lado, quando se semearam as NSCs em meio isento de soro e com 20 ng/ml de fator de crescimento bFGF (do inglês *basic fibroblast growth factor*) evidenciou-se maior proliferação nos filmes, seguido das condutas multimicrotubulares e por último as matrizes porosas [6]. Este estudo evidencia que tanto a diferenciação como a proliferação celular dependem da topologia do material.

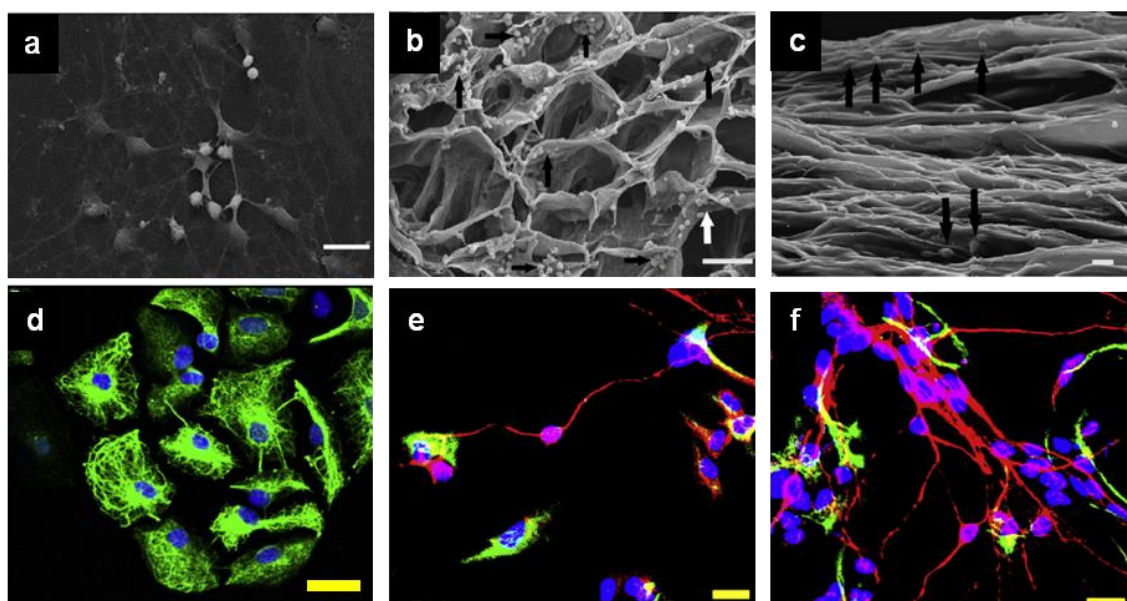


Figura 1.6- Imagens das NSCs diferenciadas nos scaffolds de CS, ao 5º dia de cultura na presença de 10% FBS. Estas imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de varrimento (a-c) e imunofluorescência (d-f). (a,d) NSCs diferenciadas nos filmes de CS; (b, e) NSCs diferenciadas nas matrizes porosas de CS; (c,f) NSCs diferenciadas nas condutas multimicrotubulares de CS. Barra da escala: (a) e (c)-10 µm; (d-f)- 20 µm; (b)- 100 µm. As setas indicam as células. Adaptado de [6].

1.2.1.2.1 Condutas neurais

As potencialidades da regeneração assistida por enxertos e a utilização de condutas neurais no tratamento de lesões no SNP, motivaram o estudo da possibilidade de usar condutas neurais como estruturas de apoio à regeneração na espinal medula [18]. As condutas neurais são

scaffolds 3D, com conformação tubular, que podem ter o interior oco ou preenchido. São desenhadas por forma a oferecer um ambiente propício ao restabelecimento das ligações neuronais. Vários tipos de arquiteturas foram propostas, tais como: paredes internas constituídas por fibras submicrométricas alinhadas e interiores preenchidos por fibras ou hidrogéis. Para além de promoverem a regeneração axonal guiada, elas podem assistir o transplante de células e atuarem como veículo para o transporte de biomoléculas ou agentes terapêuticos [19, 20].

Os biomateriais selecionados para a construção de condutas neurais podem ser de origem natural ou sintética, mas devem obedecer a algumas especificações, tais como: serem biocompatíveis, evitando reações imunológicas adversas; biodegradáveis a uma taxa de degradação ajustada à regeneração; as propriedades mecânicas devem permitir a sua boa integração na zona da lesão e devem propiciar a adesão celular e o crescimento axonal. Estruturalmente as condutas devem ter uma porosidade que permita a infiltração celular e o estabelecimento de uma rede vascular capaz de garantir a circulação de nutrientes e resíduos [16, 21].

Os polímeros são os materiais usados em Engenharia de Tecidos no desenvolvimento de condutas neurais. Os sintéticos não apresentam a variabilidade dos polímeros naturais. São interessantes na medida em que é possível controlar a sua estrutura química que tem uma grande influência nas propriedades dos *scaffolds*. [16-18]. Muitos são aprovados para utilização em dispositivos médicos pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) [16]. Poliésteres como: poli(ácido glicol) (PGA) [10], poli(ácido L-láctico) (PLLA) [22], poli(caprolactona) (PCL) [23, 24], poli(3-hidroxibutirato) (PHB) [25] e os seus copolímeros, a polidioxanona (PDS) [26] e o poli(acrilonitrilo-co-acrilato de metilo) (PAN-MA) [27] têm sido investigados para *scaffolds* na área de engenharia de tecido neural [17]. Por exemplo, Xie, J., *et al.*, 2009, prepararam matrizes de fibras alinhadas e desalinhadas de PCL, pela técnica de electrofiação, e nelas semearam e diferenciaram células estaminais embrionárias. Este processo originou células neuronais diferenciadas, e o crescimento de neurites paralelas à direcção e no alinhamento das fibras [28].

Os polímeros naturais são geralmente hidrofílicos e podem apresentar locais de adesão celular específica [7]. No entanto, para a sua utilização é necessário proceder a uma extensa purificação e a sua variabilidade é uma desvantagem [19]. De entre os polímeros naturais investigados para a construção de *scaffolds* evidenciam-se: o colagénio [29] [20], o CS [30] [6], a gelatina [31] [32] e o ácido hialurónico [33] [19].

Yi, X., *et al.*, 2010 observaram a diferenciação de NSCs em *scaffolds* de CS, obtidos por liofilização, na presença do fator de crescimento nervoso [34].

Estudos *in vivo* revelaram que a implantação de condutas tubulares de CS com fibras de alginato e de CS com colagénio (tipo I) são capazes de promover a funcionalidade dos membros posteriores paralisados de ratos, 10 e 12 meses após a operação, respetivamente [35, 36].

Num estudo realizado por Du, B.L., *et al.*, 2015 foram semeadas células estaminais neurais geneticamente modificadas, expressando o gene Trk em *scaffolds* de gelatina com conformação de esponja. Adicionalmente juntou-se neurotrofina-3. Esses *scaffolds* foram implantados na espinal medula de ratos totalmente seccionada (com 2 mm removidos). Observou-se que o *scaffold* promoveu a regeneração axonal e a recuperação funcional parcial dos membros posteriores [32].

Para reunir vantagens e colmatar desvantagens de alguns polímeros, recorre-se, muitas vezes, à mistura de polímeros, frequentemente misturas de polímeros naturais e sintéticos [17]. Em 2004, Zhang, Y., *et al.*, demonstraram que a produção de membranas compósitas de gelatina/PCL, obtidas por electrofiação, resultam num *scaffold* com boas propriedades quando comparados com os obtidos a partir destes materiais em separado [37].

Ghasemi-Mobarakeh, L., *et al.* 2008 [38] estudaram a proliferação e diferenciação de NSCs em *scaffolds* de fibras submicrométricas de PCL e de PCL/gelatina, paralelamente alinhadas e desalinhadas. As estruturas de PCL/gelatina mostraram maiores taxas de proliferação e de diferenciação neuronal do que os *scaffolds* de PCL. Verificou-se ainda que as neurites seguiram a direção das fibras alinhadas, o que evidencia como a topografia destas fibras propicia um ambiente único à extensão orientada dos axónios [39].

2 Materiais e métodos

Neste capítulo apresentam-se os materiais poliméricos estudados, visando a sua adequação como suportes celulares a integrar numa conduta neural, nomeadamente gelatina, quitosano (CS) e policaprolactona (PCL).

A metodologia seguida envolveu os seguintes passos:

Produção de matrizes de fibras depositadas sem orientação preferencial (desalinhadas) e paralelamente alinhadas (fibras alinhadas), por electrofiação. As matrizes de gelatina foram submetidas a processos de reticulação para aumentar a sua estabilidade em água, avaliando-se depois a eficácia destes processos através de testes de perda de massa e ensaios de ninidrina.

Dado que as propriedades físico-químicas e morfológicas de um *scaffold* são muito relevantes nas respostas celulares que o *scaffold* elicita, foram realizados: testes de tração mecânica, espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*).

A interação de células com as matrizes dos diversos materiais foi avaliada *in vitro* em ensaios de viabilidade, realizados com fibroblastos da linha celular HFFF2. Foram determinadas taxas de adesão e proliferação. Subsequentemente, procedeu-se à diferenciação neuronal de células da linha SH-SY5Y em matrizes de fibras alinhadas dos diferentes materiais. O processo foi monitorizado através da análise morfológica das células efetuada por microscopia de fluorescência.

2.1 Materiais

Neste estudo foram analisados materiais naturais – a gelatina e o CS – e um sintético – o PCL. Foram consideradas gelatina de três origens diferentes: de porco, de bovino e de peixe. Para facilitar a electrofiação do CS, usaram-se pequenas quantidades de poli(óxido de etileno). Seguidamente serão apresentadas as principais propriedades de cada um destes materiais.

2.1.1 Gelatina

A gelatina é um polímero natural, obtido através da hidrólise controlada do colagénio que se encontra na pele, ossos e tecidos conjuntivos dos animais [40, 41]. O processo compreende três passos principais: o pré-tratamento da matéria-prima, a extração da gelatina e a purificação/secagem [41].

No pré-tratamento o colagénio sofre hidrólise química, ocorrendo a quebra de ligações covalentes de hidrogénio e, conseqüentemente, a destabilização da estrutura em tripla hélice, o que resulta na conversão em gelatina solúvel [42-44].

A hidrólise química pode processar-se em ambiente ácido ou alcalino [45], dos quais resultam gelatinas com pontos isoelétricos (PI) diferentes, comercialmente designadas como gelatina do Tipo A (positivamente carregada, PI 6-9) e gelatina do Tipo B (negativamente carregada, PI 4-5), respetivamente [41]. O tratamento ácido é mais adequado para colagénio com menos ligações de hidrogénio, encontrado em porcos ou peixes, enquanto o tratamento alcalino é adequado para o colagénio de origem bovina [41].

As propriedades da gelatina são afetadas pela sua composição em aminoácidos, semelhante à do colagénio que lhe deu origem (ver Anexo 1). Caracteriza-se por uma repetição da sequência Glicina-X-Y, onde o X e Y são outros aminoácidos (frequentemente X é a prolina e o Y a hidroxiprolina). Atualmente, estão identificados cerca de vinte e sete tipos de colagénio, classificados em tipo I, tipo II e tipo III.

A gelatina é biocompatível, biodegradável e propícia a adesão celular devido ao reconhecimento celular específico das sequências arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Assim torna-se um polímero muito interessante para a Engenharia de Tecidos [42].

A pele de porco é a maior fonte mundial de gelatina (devido ao baixo custo de produção), seguida da gelatina proveniente da pele e dos ossos de bovinos. As gelatinas de peixe, ovelha e aves apresentam uma quota de mercado bastante reduzida [46]. No entanto, nas últimas décadas, devido não só a aspetos socioculturais mas também por questões relacionadas com a transmissão de doenças, tem crescido o interesse em valorizar os subprodutos da indústria do peixe. Comparadas com as gelatinas de mamíferos terrestres, as gelatinas de peixe apresentam um baixo teor em prolina e hidroxiprolina, o que lhe confere propriedades que podem restringir a sua aplicabilidade [44].

A fim de melhorar as propriedades da gelatina, nomeadamente a sua estabilidade em meios aquosos, propriedades mecânicas e taxa de degradação *in vivo*, recorre-se muitas vezes a

técnicas de reticulação físicas (como por exemplo processo desidrotérmico) ou químicas (como por exemplo a exposição a Glutaraldeído).

2.1.2 Quitosano

O CS é um polissacárido linear natural, derivado da desacetilação parcial alcalina da quitina. A quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza (depois da celulose), encontrando-se no exosqueleto dos artrópodes e na parede celular dos fungos [47-49].

Quimicamente, tanto a quitina como o CS são copolímeros formados pelos monómeros *N*-glucosamina (unidade desacetilada) e *N*-acetil-glucosamina (unidade acetilada), distribuídos aleatoriamente numa cadeia polimérica, ligados por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 2.1) [50]. Na desacetilação alcalina da quitina, ocorre a substituição dos grupos acetil (COCH_3) por hidrogénio. Quando o número de unidades de *N*-glucosamina é superior a 50%, o biopolímero é denominado CS, caso contrário designa-se quitina [50, 51].

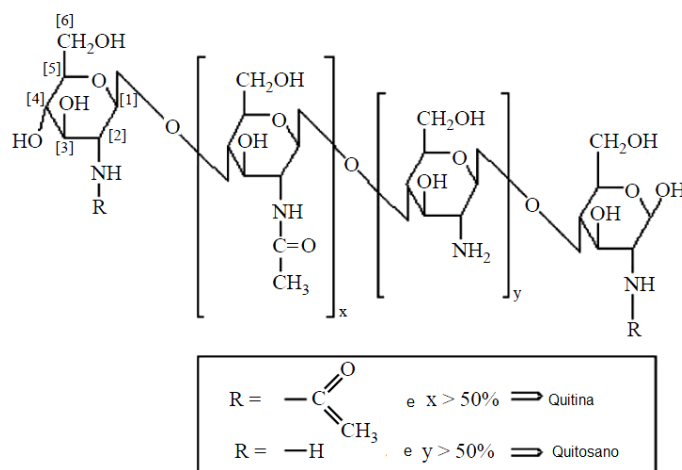


Figura 2.1- Estrutura química da quitina e do CS, com x unidades de *N*-acetil-glucosamina e y unidades de *N*-glucosamina. Adaptado de [51].

O peso molecular e o grau de desacetilação (tipicamente entre 50 a 2000 kDa) são características importantes do CS, que influenciam as propriedades dos materiais que integram a sua composição [52]. A solubilidade do quitosano em soluções aquosas é fortemente influenciada por estas características bem como pelo pH e pela força iónica da solução [47, 49]. Enquanto a quitina é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, o CS é solúvel em soluções aquosas de ácidos (frequentemente são usados ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico) com um pH abaixo de 6. Nestas condições os grupos amina primários do CS protonam, o que torna o CS um

polieletrólito catiónico solúvel em água [47, 49]. A viscosidade de uma solução polimérica num determinado solvente depende do peso molecular e da concentração do polímero. Aparentemente, o grau de desacetilação pode influenciar a viscosidade das soluções de CS, alterando as forças de repulsão inter e intramoleculares.

As características do CS em meio biológico são também influenciadas pelo seu grau de desacetilação. Foi demonstrado que a taxa de degradação aumenta à medida que diminui o grau de desacetilação, e que a cinética de degradação está inversamente relacionada com o grau de cristalinidade (que é controlado pelo grau de desacetilação). O CS com grau de desacetilação mais baixo pode induzir reposta inflamatória aguda [48].

O CS já encontrou diversas aplicações, tais como a utilização como excipiente, plataforma para a libertação controlada de fármacos, agente floculante na absorção de gorduras [52].

As suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade, propriedades antimicrobianas, propriedades de cicatrização e anti-inflamatórias tornam-no muito apelativo para a utilização em Engenharia de Tecidos [52].

2.1.3 Póli(óxido de etileno)

O poli(óxido de etileno) (PEO) é um poliéster, de fórmula molecular $(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n$, solúvel em água [53]. É obtido do óxido de etileno, na presença de catalisadores metálicos [54]. Tem uma estrutura semicristalina, é hidrofílico e não tóxico. [55] A sua temperatura de fusão cristalina situa-se entre os 62-67°C [54].

Neste trabalho, foi utilizado PEO de peso molecular elevado com o objetivo de facilitar e proporcionar uma melhor electrofiação do CS [48].

2.1.4 Policaprolactona

A PCL é um poliéster alifático linear (Figura 2.2) caracterizado por ser semi-cristalino, hidrofóbico, biocompatível e biodegradável [7, 56]. Pode ser obtido através da polimerização, por abertura da unidade monomérica do anel cíclico ϵ -caprolactona [57].

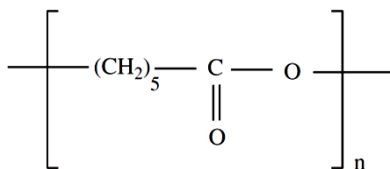


Figura 2.2- Estrutura química da PCL. Adaptado de [57].

Este polímero sintético tem um ponto de fusão baixo (60°C) e uma temperatura de transição vítrea próxima de -60°C [58, 59]. A baixa taxa de degradação hidrolítica nas suas ligações éster é compatível com aplicações de longa durabilidade – estima-se que a sua taxa de degradação *in vivo* seja de dois a três anos, dependendo do seu peso molecular [7, 58, 60].

A PCL é solúvel numa vasta gama de solventes orgânicos tais como clorofórmio, acetona, cloreto de metileno, hexafluoropropanol e misturas destes [56, 57, 60].

Apesar de ser um material que tem dado boas indicações para o desenvolvimento de *scaffolds* para Engenharia de Tecidos, a sua hidrofobicidade e falta de sítios específicos para reconhecimento celular podem ser colmatados, respetivamente, através de tratamentos com plasma e por incorporação de polímeros biologicamente ativos (tais como, colagénio ou gelatina) [60].

2.2 Electrofiação

A electrofiação permite produzir a partir de soluções poliméricas, matrizes porosas de fibras submicrométricas (o seu diâmetro é tipicamente da ordem da centena de nanómetros mas pode chegar aos micrómetros), com uma grande razão área superficial/volume [61]. O processo é relativamente barato e versátil, permitindo um certo controlo do diâmetro e orientação das fibras depositadas [61, 62].

A Figura 2.3 apresenta uma ilustração esquemática da configuração básica de uma montagem para levar a cabo o processo de electrofiação. Dela fazem parte: uma bomba injetora que controla o caudal a que é ejetado da seringa, através de um capilar metálico (agulha), uma solução polimérica carregada; uma fonte de alta tensão (na ordem das dezenas de kV) que carrega a solução e cria um campo elétrico que orienta o jacto polimérico e, um coletor metálico ligado à terra onde se depositam as fibras [62]. O coletor pode apresentar várias geometrias bem como movimento.

Quando o campo elétrico na ponta da agulha vence a tensão superficial da gota de solução polimérica, esta adquire uma forma cônica, denominado cone de Taylor [62]. Devido às forças repulsivas entre as cargas, o jacto polimérico é estirado enquanto é dirigido para o coletor pelo campo elétrico, dando origem a uma matriz de fibras.

A electrofiação é influenciada por parâmetros de produção, propriedades da solução e parâmetros ambientais (temperatura e humidade relativa) [62]. É necessário haver um balanço entre os parâmetros para que o processo ocorra.

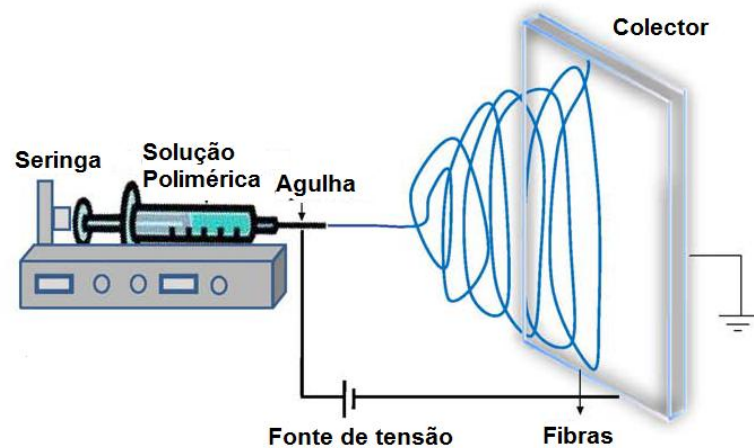


Figura 2.3- Esquema de electrofiação. Adaptado de [61].

2.2.1 Parâmetros de produção

Os parâmetros de produção incluem: o diâmetro interno da agulha, o caudal imposto à solução, a distância entre a agulha e o coletor, o tipo de coletor e a tensão aplicada.

O diâmetro da seringa e a taxa à qual a solução polimérica é ejetada, controlam a quantidade da solução polimérica disponível para fiação e, conseqüentemente, têm impacto no diâmetro das fibras [61, 63].

A tensão aplicada é fator chave no processo de electrofiação [61]. Um aumento da tensão aplicada à agulha geralmente conduz à diminuição dos diâmetros das fibras poliméricas, devido ao aumento das forças repulsão electroestáticas [62].

A morfologia e o diâmetro das fibras dependem da distância entre a agulha e o coletor. Esta distância influencia o tempo de voo da solução até ao alvo e, conseqüentemente, o tempo disponível para a evaporação do solvente. Se o solvente não evaporar antes das fibras chegarem ao coletor ocorrerá fusão das mesmas [61].

Em geral são usados coletores de dois tipos: planos ou cilíndricos rotatórios. Estes coletores são normalmente revestidos por uma folha de alumínio [61]. Ambos permitem a recolha de fibras sem nenhum alinhamento restrito, enquanto que o coletor rotatório tem a vantagem de recolher fibras paralelamente alinhadas. Este grau de alinhamento pode ser parcialmente controlado através do diâmetro e velocidade de rotação do coletor.

2.2.2 Propriedades da solução

As propriedades da solução polimérica, tais como a concentração, a viscosidade, a condutividade elétrica e tensão superficial, determinam se esta pode ou não ser electrofiada e, têm influencia direta na morfologia da fibra [62]. Se a solução for demasiado concentrada, não se conseguirá fiar devido à elevada viscosidade que dificulta o estiramento [64]. Inversamente, se for muito diluída, formar-se-ão gotas sem que se estabeleça um jacto, ou formar-se-ão contas ao longo da fibra [64]. Normalmente, um aumento da concentração da solução aumentará o diâmetro das fibras [62, 64].

A condutividade elétrica da solução caracteriza a capacidade desta transportar carga elétrica, o que é essencial para o estiramento do jacto. A condutividade da solução é determinada

quer pelo polímero que a integra, quer pelo solvente escolhido para a sua dissolução. Depende ainda da concentração e da temperatura [62].

Para que, a partir da gota que surge na ponta da agulha se forme um jato de solução polimérica, é necessário que a tensão aplicada supere a tensão superficial dessa mesma gota [62]. Diferentes solventes contribuem para diferentes tensões superficiais [61, 62]. Geralmente, as soluções com baixas tensões superficiais produzem fibras sem contas. Soluções com elevadas tensões superficiais, impossibilitam a electrofiação devido à instabilidade dos jatos e à ocorrência de pulverização de gotas (fenómeno designado por *electrospray*) [61].

A viscosidade é uma propriedade reológica da solução que depende do polímero e solvente que compõem, pois varia com o peso molecular do polímero e com a sua concentração [61, 62]. Diversos estudos têm mostrado que o efeito da viscosidade influencia o diâmetro das fibras e a sua morfologia [61, 62]. Quando a viscosidade é muito baixa, não é possível fiar em contínuo ou surgem contas nas fibras. Uma viscosidade muito elevada dificulta o estiramento do jato [61]. Em geral, produzem-se fibras com maiores diâmetros e maior uniformidade quando se aumenta a viscosidade da solução.

2.2.3 Parâmetros ambientais

As condições do ambiente onde se processa a electrofiação, tais como a temperatura e a humidade relativa, influenciam o processo e a morfologia das fibras [63]. A temperatura influencia a taxa de evaporação dos solventes. A humidade relativa condiciona também a taxa de evaporação dos solventes de base aquosa. Se a evaporação do solvente for muito rápida, o fio perde rapidamente a possibilidade de ser estirado devido ao aumento da viscosidade [61].

2.3 Preparação das matrizes de fibras

Os polímeros e os solventes seleccionados para este trabalho, bem como as suas especificações apresentam-se na Tabela 2.1. Foi ainda usada água destilada.

Tabela 2.1- Materiais e solventes utilizados para preparação de soluções de electrofiação.

Material/ abreviatura	Fórmula química / Fonte	Massa molecular [g/mol]	Fornecedor
Gelatina de Porco/ GP	Pele de porco	50 000-100 000	Sigma-Aldrich®
Gelatina de bovino/ GB	Pele de Bovino	50 000-100 000	Sigma-Aldrich®
Gelatina de Peixe/ GPx	Pele de peixe de água fria	60 000	Sigma-Aldrich®
Quitosano/ CS	$(C_8H_{13}O_5N)_{0,245n} (C_6H_{11}O_4N)_{0,755n}$	500 000	Cognis S
Poli(óxido de etileno)/ PEO	$(CH_2CH_2O)_n$	2 000 000	Sigma-Aldrich®
Policaprolactona/ PCL	$(CH_6H_{10}O_2)_n$	70 000-90 000	Sigma-Aldrich®
Ácido acético glacial/ AAC	CH_3COOH	60,05	Scharlau
Clorofórmio/ Clorof	$CHCl_3$	119	Carlo Erba Reagents

2.3.1 Soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram preparadas com concentrações que permitem o seu processamento por electrofiação. Nos casos das gelatinas de GB e GP testaram-se diferentes concentrações, mas nos outros casos usaram-se concentrações apuradas noutros trabalhos do grupo. Na Tabela 2.2 apresenta-se a composição das várias soluções usadas na electrofiação. As concentrações dos polímeros nas soluções indicam-se em percentagem mássica (% w/w). No caso do solvente resultar de uma mistura, a composição é indicada pela percentagem volumétrica de cada componente na mistura (% v/v).

Tabela 2.2-Soluções poliméricas para electrofiação.

Polímero	Concentração polimérica	Solvente
	% w/w	% v/v
GP	20%	90% AAC em água
GB	20%	90% AAC em água
GPx	25%	90% AAC em água
CS; PEO	1,8%; 0,4%	90% AAC em água
PCL	10%	Clorof

Após a mistura dos componentes, as soluções foram colocadas sob agitação magnética para facilitar a dissolução do polímero. Estas soluções foram utilizadas 24h após a sua preparação.

2.3.2 Electrofiação das soluções

Na realização deste trabalho utilizaram-se montagens do sistema de electrofiação que diferem essencialmente no coletor usado para a recolha das fibras e no respetivo sistema de controlo de movimento.

2.3.2.1 Estabelecimento das condições de processamento

O trabalho iniciou-se com estabelecimento das condições de fiação das soluções poliméricas. Nesta avaliação foi utilizada a montagem apresentada na Figura 2.4. Este sistema compreende uma seringa para a colocação da solução polimérica, uma bomba injetora para o controlo do caudal a que polímero é dispensado. À seringa é acoplada uma agulha (neste trabalho foi usada uma de Calibre 23), onde é ligado um crocodilo que estabelece a ligação à fonte de alta tensão. O coletor plano de metal (20 x 20 cm²) ligado à terra é coberto por uma folha de alumínio, e a sua distância à ponta da agulha é ajustável.

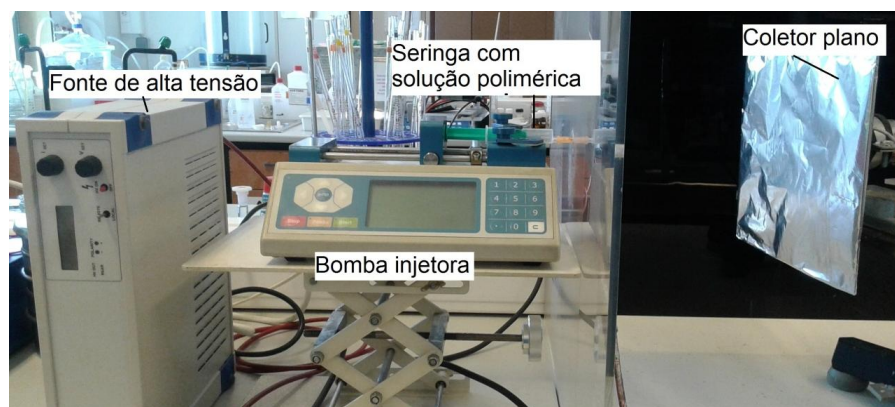


Figura 2.4- Montagem do sistema de electrofiação utilizado para testes iniciais. O sistema compreende uma seringa BIBraun Inject® de 5mL e, diâmetro interno de 12,48 mm; uma bomba injetora Chemix Fusion 100; uma fonte de alta tensão Iseg T1CP 300 304 p.

Tendo em conta a estabilidade do processo e a análise morfológica das fibras obtidas, efetuada com recurso ao microscópio ótico (Nikon Eclipse LV 100), estabeleceram-se as condições de fiação de cada polímero.

2.3.2.2 Amostras de fibras desalinhadas

Na produção das matrizes de fibras desalinhadas, o coletor plano foi substituído por um coletor cilíndrico, com um diâmetro de 6 cm (e 21 cm de comprimento), como mostra a Figura 2.5. Este coletor é controlado por dois motores que permitem estabelecer movimentos de rotação e de translação a baixas velocidades, de forma a obter deposições de fibras de espessura circunferencialmente uniformes e, mais homogêneas, ao longo de numa maior área da superfície do coletor.

As matrizes de fibras desalinhadas para os testes de perda de massa, ensaios de ninidrina, testes de tração, SEM e FTIR foram recolhidas sobre folha de alumínio. Para as culturas celulares (com células HFFF2), fixaram-se à folha de alumínio lamelas de vidro (12 mm de diâmetro) graças à tensão superficial de uma gota de água colocada entre a lamela e a folha.

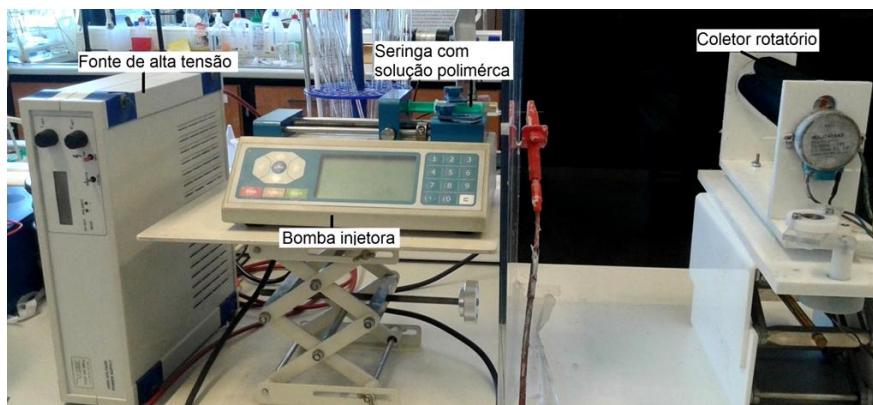


Figura 2.5- Montagem do sistema de electrofiação utilizado para obtenção de fibras desalinhadas. O sistema difere da figura anterior no coletor usado- coletor cilíndrico rotatório a baixa velocidade.

2.3.2.3 Amostras de fibras alinhadas

O esquema de electrofiação utilizado para produção das fibras alinhadas é idêntico ao utilizado para a produção das desalinhadas à exceção do coletor. O coletor usado na produção das fibras alinhadas possui um diâmetro de 8 cm (21 cm de comprimento) e atinge uma velocidade máxima de rotação de 4000 rpm. Na Figura 2.6 está representada a montagem utilizada.

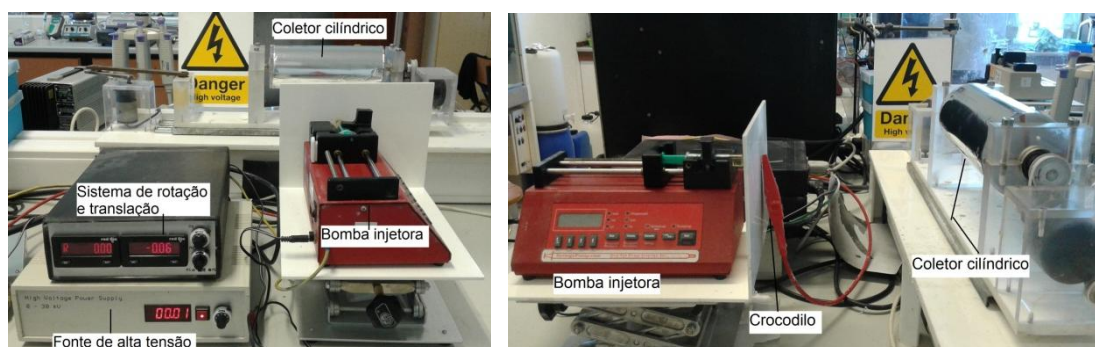


Figura 2.6- Montagem do sistema de electrofiação utilizado para obtenção de fibras alinhadas, visto de duas diferentes perspectivas. O sistema compreende uma seringa BIBraun Inject® de 5mL e 12,48 mm de diâmetro interno; uma bomba injetora New Era Pump Systems; uma fonte de alta tensão construída no laboratório (GREAT); um coletor cilíndrico que pode atingir altas velocidades de rotação.

As amostras de matrizes de fibras alinhadas de gelatina usadas nas culturas de células neuronais SH-SY5Y, foram depositadas em folha de alumínio, reticuladas e fixadas em lamelas de vidro sobre a deposição, usando uma pequena quantidade de solução de PCL (10% w/w em clorofórmio). Após a evaporação do solvente, a solução aplicada dá lugar a um filme, que permite individualizar uma amostra por lamela, mantendo a organização das fibras alinhadas porque as fixa nas bordas da lamela. As amostras de fibras alinhadas de CS e PCL usadas nas culturas foram depositadas diretamente em lamelas de vidro coladas ao papel de alumínio, com fita-cola de dupla face e posteriormente recortadas.

2.3.3 Reticulação da gelatina

A reticulação da gelatina melhora a estabilidade das matrizes em meios aquosos e diminui a taxa de degradação *in vivo*. O processo afeta ainda as propriedades mecânicas do material.

Os processos de reticulação podem ser físicos ou químicos. A irradiação ultravioleta e o tratamento desidrotérmico são processos físicos que podem promover a formação de ligações cruzadas entre as cadeias da gelatina [65, 66]. Este tipo de reticulação não introduz substâncias exógenas no material mas, geralmente, conduz a graus de reticulação baixos. A reticulação química é conseguida através da reação entre os grupos dos agentes químicos e dos polímeros [66]. O glutaraldeído e a carbodiimida são reagentes químicos reticulantes da gelatina.

Neste trabalho foi utilizado um método físico de reticulação da gelatina – o processo desidrotérmico – e um método químico – exposição a vapor de glutaraldeído.

2.3.3.1 Tratamento Desidrotérmico

Durante o tratamento desidrotérmico, DHT, a reticulação das proteínas é promovida pela sua exposição a uma temperatura elevada durante um certo intervalo de tempo [65]. Normalmente, o processo é conduzido mantendo o polímero a temperaturas superiores a 90°C e em vácuo, durante vários dias [13]. Sobre estas condições, é extraída a água que é libertada durante reações de condensação entre grupos carboxilo e grupos amina de cadeias adjacentes ou por reações de esterificação. Desta forma, promove-se a formação de ligações intermoleculares cruzadas que aumentam a estabilidade do material [65, 67]. Para além de não fazer uso de reagentes tóxicos, esta técnica tem a vantagem de deixar esterilizadas as amostras [13].

Neste estudo, as amostras de gelatina foram submetidas a uma temperatura de 140°C na estufa (Nüve EV018), durante 72h, sob vácuo.

Também se procedeu à reticulação do CS, a 140°C numa estufa (P Selecta[®] Digiteheat), durante 72 e 144h horas, sem assistência de vácuo.

2.3.3.2 Exposição ao vapor de Glutaraldeído

O glutaraldeído ($C_5H_8O_2$), GTA é o reagente mais vulgarmente utilizado para a reticulação do colagénio e da gelatina [68]. É barato, solúvel em água e envolve uma reação rápida entre os grupos aldeído e os grupos amina (NH_2) da lisina, hidroxilisina ou arginina [68]. Destas reações resultam bases de Schiff ($R-HC=NR'$), como representado na Figura 2.7[68, 69].

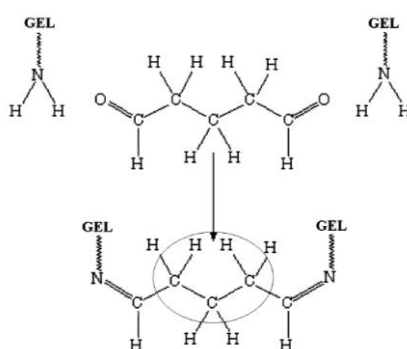


Figura 2.7- Mecanismo de reticulação da gelatina por GTA. Adaptado de [5].

A reticulação com GTA potencia citotoxicidade do material devido à presença de grupos aldeído não reagidos [68, 70]. Tem-se mostrado que esta toxicidade pode ser atenuada reduzindo a concentração do GTA usado na reticulação ou, promovendo a reação dos grupos aldeído não reagidos com glicina [69, 71].

Neste trabalho, a reticulação com GTA foi efetuada colocando as matrizes de gelatina numa caixa hermeticamente fechada, contendo dois recipientes abertos com 5 mL de solução aquosa de GTA (Merck KGaA), por um determinado intervalo de tempo. Usaram-se concentrações de GTA de 5% e 50%. Seguidamente, colocou-se a caixa numa estufa (P Selecta[®] Incubigig), a 37°C. Foram utilizados diferentes intervalos de tempo de reticulação. No final do processo, as amostras foram colocadas durante pelo menos 48h num exsiccador em vácuo, de forma a eliminar os resíduos de GTA não reagidos.

2.3.4 Caracterização das matrizes

Todas as matrizes foram analisadas quanto à sua morfologia e propriedades mecânicas (testes de tração). No caso das matrizes de gelatinas foi analisada a composição química (ATR-FTIR) e a morfologia antes e depois dos tratamentos de reticulação. Foram ainda efetuados testes de perda de massa e ensaios de ninidrina para avaliação do grau de reticulação.

2.3.4.1 Morfologia

Ao longo do trabalho, recorreu-se a imagens de microscopia ótica (Nikon Eclipse LV 100) para analisar a morfologia das fibras electrofiadas. Este microscópio encontrava-se ligado a uma câmara que comunicava com o computador, através de um sistema de aquisição de dados recorrendo ao *software NIS Elements*. Para uma avaliação mais detalhada da morfologia e para a medição do diâmetro e da orientação das fibras, recorreu-se a imagens de SEM.

Ao serem observadas em SEM (Zeiss DSM-962 CENIMAT/I3N), as amostras foram coladas num suporte metálico com uma fita de carbono de dupla face. Posteriormente foram pulverizadas com um banho de ouro/paládio (60:40) para melhorar a condutividade das mesmas e consequentemente o contraste da imagem.

2.3.4.2 Diâmetro das fibras

O diâmetro das fibras produzidas foi medido a partir das imagens de SEM, recorrendo ao *software ImageJ*. Foram calculados os valores do diâmetro médio e do desvio padrão.

2.3.4.3 Orientação das fibras

Para análise da orientação das fibras nas matrizes, foram medidos os ângulos da direção de orientação de 50 fibras em relação a uma linha de referência. Tal como para a medição dos diâmetros, recorreu-se às imagens de SEM e ao *software ImageJ* para efetuar as medidas e, a partir delas, calculou-se o valor médio e o desvio padrão.

2.3.4.4 Perda de massa

O grau de reticulação das matrizes de gelatina pode ser avaliado pela determinação da perda de massa de amostras reticuladas quando imersas em água – uma maior perda de massa corresponderá a um menor grau de reticulação. Para o estudo da perda de massa, as matrizes depositadas em folha de alumínio foram colocadas 48h num exsiccador sob vácuo para remover os restos de solvente. Posteriormente foram cortadas 4 amostras quadradas (de duas matrizes) de 2 x 2 cm² e reticuladas por DHT ou GTA. As amostras reticuladas por exposição ao vapor de GTA voltaram para o exsiccador por um período mínimo de 48h, para que fosse removido o GTA não reagido. Seguidamente as amostras foram retiradas do exsiccador e pesadas imediatamente numa balança (Radwag XA82/220/2X) para que se determinasse a sua massa m_i . Cada amostra foi depois imersa num recipiente com água destilada, durante 24h, a 37°C. Seguidamente, as matrizes foram retiradas do banho e colocadas a secar numa estufa (P.Selecta® Incu-digit) a 37°C, durante 24h. Para finalizar, fez-se uma nova pesagem de cada amostra para determinar m_f . A percentagem de massa perdida foi calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (2.1)$$

2.3.4.5 Ensaio de ninidrina

O ensaio da ninidrina é um teste colorimétrico utilizado para detetar aminoácidos [72]. A ninidrina reage com os grupos amina livres, produzindo grupos aldeído (R-CHO), dióxido de carbono (CO₂) e um produto de cor púrpura, designado de púrpura de *Ruhemann* [4, 73]. As etapas da reação encontram-se indicadas na Figura 2.8. A quantidade do produto púrpura formado é proporcional ao número de aminas reagidas e pode ser avaliada espectrofotometricamente.

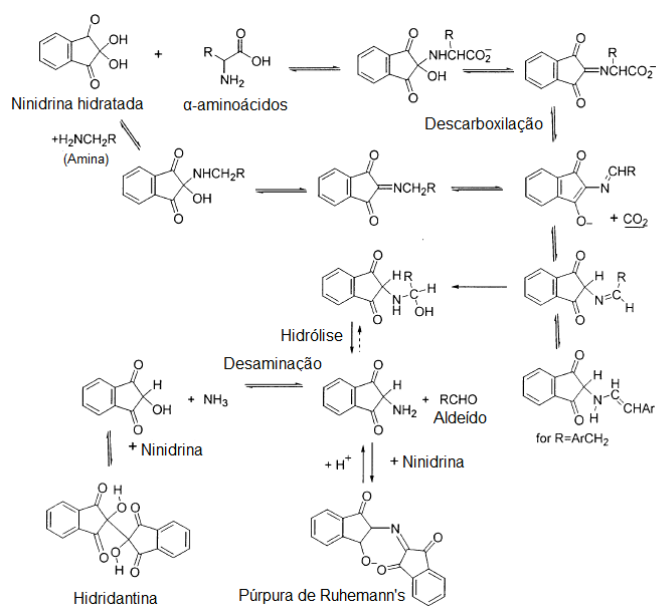


Figura 2.8- Reações da ninidrina com um aminoácido, originando a formação de púrpura de *Ruhemann*. Adaptado de [4].

No presente trabalho, este ensaio foi realizado com o objetivo de caracterizar as diferentes gelatinas e avaliar o grau de reticulação das matrizes produzidas a partir de cada uma delas, através da variação relativa de grupos amina livres devido à reticulação.

Neste sentido, para cada tipo de gelatina (material de partida usado na preparação das soluções a electrofiar) foi determinada a correlação entre a sua concentração em soluções aquosas e os grupos amina livres. Os detalhes do procedimento encontram-se descritos no Anexo 2. Em traços largos, ao volume de cada solução de gelatina adicionou-se o mesmo volume de solução de ninidrina (Alfa Aesar®) dissolvida em DMSO (Merck-Schuchardt). A mistura foi colocada a uma temperatura entre os 80-95°C, durante 60 minutos. Após este período, foi avaliada a absorvância a 570 nm, associada à formação de púrpura de *Ruhemann*, isto é, ao número de amins livres presentes na solução de gelatina testada. A correlação entre absorvância, Abs , e concentração, $[c]$, segue uma tendência linear cuja equação (2.2), foi apurada:

$$Abs = m [c] + b \quad (2.2)$$

Posteriormente, foram colocadas em contacto com o mesmo volume de água usado na preparação das soluções anteriores, 5mg de gelatina sob a forma de matriz fibrosa reticulada. Tal como nesse procedimento, seguiu-se a adição da mesma quantidade de solução de ninidrina, deixadas reagir nas mesmas condições. Após a medição da absorvância, A_r , a 570 nm, quantificou-se o número de aminas que permaneceu livre após o processo de reticulação. Assim, foi possível calcular o grau de reticulação através da seguinte expressão (2.3):

$$\% \text{ reticulação} = \frac{1}{5} \left[1 - \frac{A_r - b}{m} \right] \times 100 \quad (2.3)$$

onde b e m são os parâmetros da reta 2.2. A equação 2.3 expressa a fração de grupos amina que reagiram durante o processo de reticulação da amostra.

2.3.4.6 Tração mecânica

A caracterização mecânica das membranas produzidas neste trabalho foi realizada através de ensaios de tração. Nestes ensaios é aplicada uma força (carga) ao longo de uma direção da amostra a testar, provocando o seu alongamento até à rutura.

A tensão uniaxial, σ , define-se como o quociente entre a carga uniaxial aplicada, F , e a área inicial da secção do material perpendicular à carga, A , ou seja $\sigma = F/A$ (N/m² ou Pa). Quando sujeita a uma tensão uniaxial a amostra sofre deformação. A deformação do material, ε , é definida como a variação da dimensão da amostra na direção da aplicação da força, ΔL , relativamente à sua dimensão inicial, L_0 , isto é $\varepsilon = \Delta L / L_0$.

A Figura 2.9 apresenta um gráfico de variação da tensão versus deformação, típico de um material polimérico.

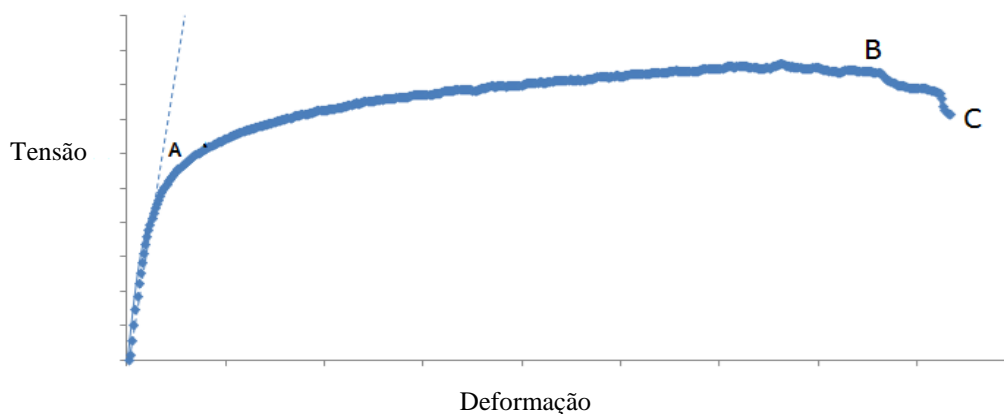


Figura 2.9- Curva de tensão versus deformação típica de um material polimérico.

A região linear (A) da Figura 2.9 é designada por região elástica, que se caracteriza por uma proporcionalidade direta entre a tensão aplicada e a deformação do material (esta relação é conhecida por Lei de Hooke). A constante de elasticidade ou módulo de Young, E , do material, corresponde ao declive da reta que expressa a proporcionalidade direta. Na gama de tensões correspondentes à região A, quando a carga é removida, o material recupera as suas dimensões iniciais. À zona linear segue-se uma região de comportamento plástico do material à qual corresponde uma deformação permanente mesmo após a remoção da carga aplicada. Dentro da região plástica a tensão atingirá um valor máximo, o qual se designa por tensão à rutura (B). A partir desse ponto o material começa a partir até à rutura (C).

As propriedades mecânicas das matrizes desalinhadas húmidas foram medidas numa máquina de tração *Reometric Scientific*, com um *software Mnimat-Firmware 3.1* instalado no computador IBM (Figura 2.10).



Figura 2.10- Equipamento usado nos testes de tração: visão global da montagem.

Cada material foi testado utilizando 4 amostras de cada uma de 3 deposições diferentes do mesmo (num total de 12 amostras). Cada amostra retangular com $1 \times 3 \text{ cm}^2$ e a sua espessura

foi medida através de um micrómetro digital, em três zonas distintas. A medição foi efetuada com a amostra entre lamelas de vidro (cuja espessura foi descontada à medição) para assim diminuir a pressão exercida pelas esperas do micrómetro sob a amostra. As amostras foram fixas no aparelho (Figura 2.11) deixando 1 cm da amostra entre as garras, isto é $L_0 = 1$ cm. Nos casos do CS e das gelatinas (que foram testadas reticuladas), as amostras foram hidratadas previamente a dar início à sua tração, já que a hidratação destes materiais (situação de interesse prático) causa alterações significativas no seu comportamento mecânico. O mesmo não sucede com a PCL – material hidrofóbico – pelo que os testes foram efetuados com o material seco.

Os ensaios de tração foram efetuados com uma célula de carga 20 N, a uma velocidade de tracionamento de 1 mm/min, exceto no caso da PCL, em que se estabeleceu uma velocidade de 2 mm/min. Os valores da força de tração aplicada e do alongamento da amostra foram gravados pelo *software* no computador e, convertidos em curvas de tração para obtenção do módulo de Young.

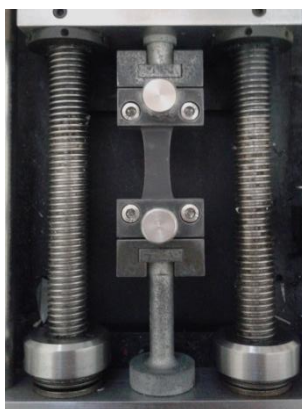


Figura 2.11- Ensaio de tração onde se observa a matriz a ser tracionada presa pelas garras.

2.3.4.7 ATR-FTIR

O FTIR é uma técnica espectroscópica vibracional que permite analisar quimicamente um material. A componente ATR-reflexão total atenuada- é um acessório que permite a análise das amostras sólidas ou líquidas sem qualquer preparação adicional.

Neste estudo, as amostras de gelatina foram analisadas por FTIR, antes e depois de sujeitas aos processos de reticulação, de modo a detetar alterações decorrentes desses processos.

2.4 Testes *in vitro*- Culturas celulares

No presente estudo, os testes *in vitro* iniciaram-se com avaliação da viabilidade celular de fibroblastos (células HFFF2) semeados em matrizes de fibras desalinhadas dos diferentes materiais. Alguns materiais foram selecionados para realizar culturas com células da linha SH-SY5Y em matrizes de fibras alinhadas.

Ambas as linhas celulares utilizadas encontravam-se disponíveis, semeadas em frascos de cultura T25 em meio de proliferação DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com D-glucose (Gi-bco), bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®), 10% de FBS (Invitrogen), 1% de GlutaMAX™ (Life Technologies), 1% de piruvato de sódio (Life Technologies) e com 1% de antibiótico penicilina - estreptomicina (Invitrogen).

Todas as culturas celulares foram realizadas numa câmara de segurança microbiológica (Labculture® Class II). As amostras dos materiais foram previamente esterilizadas, seguindo o protocolo de esterilização Anexo 3-A. Foram depois colocadas em *inserts* de teflon (onde 0,5 cm² da matriz fica disponível para cultura) e estes colocados em placas estéreis de 24 poços para cultura de células aderentes. Os controlos de células foram realizados nos poços da placa (com 2cm² de superfície) ou, no caso de se destinarem a marcação fluorescente, em lamelas de 12 mm (fixas nos *inserts* de teflon).

Quando as células no T25 atingiram uma confluência de 70 a 80%, foram tripsinadas (TrypLE) e contadas de acordo com os protocolos no Anexo 3-B e C, respetivamente. Após a sementeira ser realizada na densidade pretendida, as células foram incubadas na incubadora (MCO19AIC(UV)) a 37°C, com atmosfera controlada com 5% de CO₂.

2.4.1 Avaliação da viabilidade celular

Nalgumas culturas a viabilidade celular foi aferida através de testes colorimétricos efetuados com recurso a uma solução de resazurina dissolvida a 0,2 mg/ml em PBS.

A resazurina é um composto azul que é reduzido a resorufina (composto cor-de-rosa) pelas células metabolicamente ativas.

Antes de efetuar o teste de viabilidade, preparou-se meio de cultura para efetuar uma mudança de meio às células em cultura. A preparação consistiu em adicionar 10% da solução de resazurina acima referida ao meio DMEM completo usado na cultura. Procedeu-se depois à

mudança do meio e colocaram-se as células e meio com rezasurina a usar como controle na incubadora por 3 h. Após este período, foram retirados 150 µl do meio das várias condições em teste para uma placas de 96 poços e, efetuadas leituras de absorvância a 570 nm e 600 nm (comprimentos de onda associados à identificação da resorufina e da rezasurina, respetivamente). As medições foram efetuadas num leitor de microplacas (Biotek ELX 8000UV).

2.4.2 Avaliação da morfologia celular

No decorrer de algumas culturas celulares procedeu-se à fixação das células (Anexo 3-D), para posterior marcação dos citoesqueletos e dos núcleos (Anexo 3-E e F, respetivamente), com o intuito de avaliar a morfologia das células por microscopia ótica de fluorescência utilizando um microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse Ti-S.

2.4.3 Culturas celulares com HFFF2

As células HFFF2 (do inglês, *Human Caucasian fetal foreskin fibroblast*) são uma linha celular finita, derivada a partir dos fibroblastos isolados da derme de um feto humano de 14-18 semanas.

Os principais objetivos das culturas efetuadas com esta linha celular foram: avaliar as taxas de adesão e proliferação, através dos testes de viabilidade celular, e a morfologia das células semeadas nas matrizes de PCL, CS e gelatinas de porco, bovino e peixe, reticuladas tanto por DHT como por exposição a GTA.

Todas as sementeiras foram semeadas com uma densidade celular 2×10^4 cél/cm², usando 5 réplicas de cada condição a testar e, no mínimo 3 réplicas de controlo de células, sendo este último semeado no fundo dos poços das placas.

As viabilidades celulares foram avaliadas periodicamente ao longo de, pelo menos, 5 dias, efetuando-se leituras de viabilidade celular às 24h, e de 48h em 48h. Os testes de viabilidade celular às 24h servem para avaliar as taxas de adesão celular. As restantes leituras permitem avaliar a proliferação celular ao longo do tempo.

2.4.4 Cultura celulares com SH-SY5Y

Antes de realizar as experiências com estas células nos materiais, foram avaliadas diferentes condições de diferenciação em culturas realizadas em caixas de poços para cultura celular de células aderentes.

As células SH-SY5Y derivam de uma linha celular subclonada, originária de células tumorais, retiradas de um neuroblastoma de uma criança com 4 anos [74]. Sob determinadas condições de diferenciação, estas células desenvolvem longas neurites e são utilizadas em estudos *in vitro* como um modelo de neurónios [74-76]. Assim, antes de realizar as experiências com estas células nos materiais, foram avaliadas diferentes condições de diferenciação em culturas realizadas em caixas de poços para cultura celular de células aderentes.

A diferenciação neuronal das células SH-SY5Y pode ser conseguida com recurso a meios de diferenciação com fatores neurotróficos ou com ácido retinóico (AR). Dado o elevado custo dos fatores neurotróficos, é frequente optar-se pela utilização do AR. Foi essa a via seguida neste trabalho. Tendo como base alguns estudos onde foi utilizado AR para diferenciar células SH-SY5Y [74, 77-79], foram analisadas diferentes condições que contemplam diferentes percentagens de soro, FBS, no meio (DMEM preparado como anteriormente referido, exceto no que diz respeito à percentagem de FBS), e diferentes alturas para a troca do meio para meio de diferenciação (com AR). A redução de soro no meio tem sido associada a uma diminuição da proliferação celular em favor da sua diferenciação neuronal.

A sementeira foi realizada numa densidade celular de 10×10^3 cel/cm², semeadas no fundo do poço de uma placa com 24 poços, com DMEM a 10% de FBS. Foram analisadas 4 condições estabelecidas efetuando as trocas de meios apresentadas na tabela 2.3 ao longo das primeiras 120h de cultura.

Tabela 2.3-Condições de diferenciação das células SH-SY5Y ao longo do tempo.

	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4
24h	DMEM com FBS a 3%	DMEM com FBS a 3% e AR a 10 µM	DMEM com FBS a 3% e AR a 10 µM	DMEM com FBS a 3% e AR a 10 µM
72h	DMEM com FBS a 3%	DMEM com FBS a 3% e AR a 10 µM	DMEM com FBS a 3% e AR a 10 µM	DMEM com FBS a 1% e AR a 10 µM
120h	DMEM com FBS a 3%	DMEM com FBS a 3% e AR a 10 µM	DMEM com FBS a 1% e AR a 10 µM	DMEM com FBS a 1% e AR a 10 µM

As condições ocorridas às 120h foram mantidas durante 13 dias, efetuando-se mudanças de meio de 48h em 48h. Tal como anteriormente, a morfologia das células foi monitorizada por observação microscópica.

Tendo por base os resultados deste estudo preliminar, a condição eleita para a diferenciação das células SH-SY5Y nas matrizes de fibras alinhadas dos diferentes materiais foi a 2ª condição.

Neste sentido, a sementeira foi efetuada em 4 réplicas de cada material e em dois controlos de células semeadas em lamelas de vidro, numa densidade de 10×10^3 cel/cm². Os meios foram trocados a cada 48h durante 20 dias. Ao longo desse período, fixaram-se células nalgumas réplicas no 10º, 15º e 20º dias em cultura.

3 Apresentação e discussão de Resultados

3.1 Produção de matrizes poliméricas

Este trabalho iniciou-se com o estudo das condições de electrofiação das matrizes poliméricas de policaprolactona, quitosano e das gelatinas de peixe, porco e de bovino.

Tendo por base alguns trabalhos já efetuados no grupo, partiu-se de um conjunto de condições para a fiação de cada polímero. Sobre este conjunto variou-se uma condição/ parâmetro de fiação de cada vez, para observar o seu impacto nas características das fibras e na estabilidade do processo conduzido no sistema que inclui o coletor plano (ver Figura 2.4). Os testes foram efetuados sob condições ambientais controladas (temperatura e humidade). Os parâmetros testados compreendem: concentração do polímero na solução, caudal de ejeção da solução, ϕ , tensão aplicada à agulha, V , e distância entre a ponta da agulha e o coletor, d . Os resultados observados levaram à escolha de um conjunto de parâmetros que se considerou mais adequado à produção das matrizes.

Seguidamente, usaram-se os parâmetros apurados para avaliar no sistema com o coletor cilíndrico da Figura 2.6, o efeito da velocidade de rotação do coletor nas características das fibras recolhidas, em particular no seu alinhamento.

3.1.1 Matrizes de PCL

Para a produção de matrizes de PCL, começou por testar-se duas soluções com concentrações de 8% e 10% de PCL em clorofórmio. Partiu-se da seguinte situação de referência: $V=10$ kV, $\phi=0,5$ ml/h e $d=20$ cm.

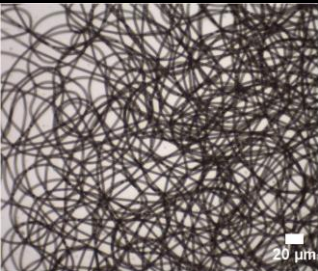
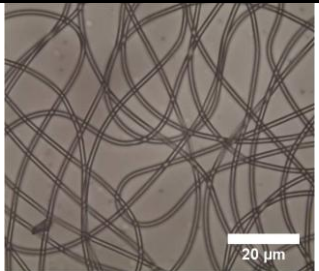
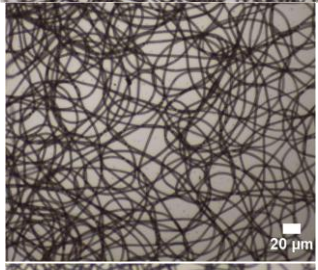
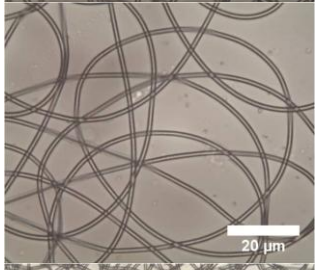
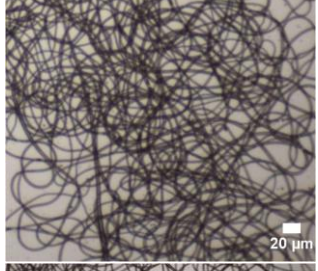
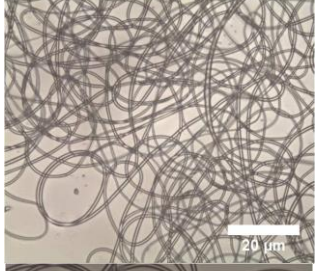
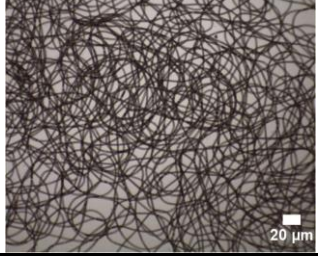
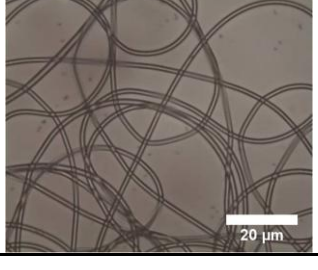
Com a condição de referência foi possível fiar ambas as soluções. No entanto, para a concentração de 8% não se obtiveram fibras uniformes, mesmo quando as condições foram alteradas para os conjuntos de parâmetros apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1-Parâmetros de electrofiação testados para a solução 8% de PCL em clorofórmio.

V (kV)	ϕ (ml/h)	d (cm)
12	0,5	20
8	0,5	20
10	0,3	20
10	0,8	20
10	0,5	15
10	0,5	25

Na Tabela 3.2 encontram-se algumas imagens obtidas no estudo da electrofiação da solução de 10% de PCL em clorofórmio.

Tabela 3.2- Imagens de microscopia ótica das fibras produzidas a partir da solução de 10% de PCL em clorofórmio, para vários conjuntos de parâmetros de produção.

Parâmetros	Ampliação (100x)	Ampliação (500x)
$V=10$ kV $\phi=0,5$ ml/h $d=20$ cm		
$V=13$ kV $\phi=0,5$ ml/h $d=20$ cm		
$V=10$ kV $\phi=0,3$ ml/h $d=20$ cm		
$V=10$ kV $\phi=0,8$ ml/h $d=20$ cm		



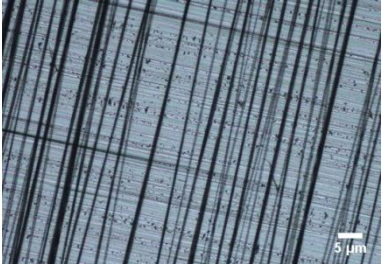
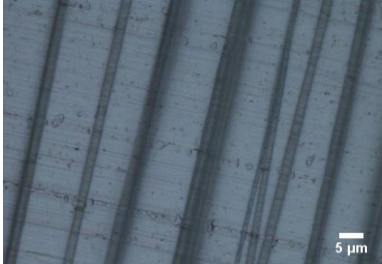
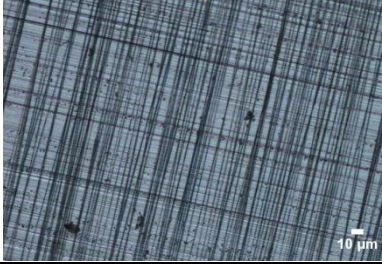

Analisando as imagens da Tabela 3.2 podemos concluir que, relativamente às condições de referência:

- O aumento da tensão para 13 kV conduziu ao aumento do diâmetro das fibras, presumivelmente devido ao aumento da aceleração do jacto na direção do coletor;
- Com a diminuição do caudal para 0,3 ml/h, verifica-se uma diminuição do diâmetro das fibras, devido à menor quantidade de solução dispensada; já quando o caudal aumenta para 0,8 ml/h o diâmetro das fibras aumenta.

Após este estudo, escolheram-se os seguintes parâmetros para a produção das matrizes de PCL: $V = 13$ kV, $\phi = 0,5$ ml/h e $d = 20$ cm.

Os resultados do efeito da velocidade de rotação do coletor cilíndrico no alinhamento das fibras de PCL estão ilustrados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3-Influência da velocidade de rotação do coletor cilíndrico no alinhamento das fibras de PCL.

Velocidade de rotação (rpm)	Ampliação (100x)	Ampliação (500x)
100		
1000		
4000		

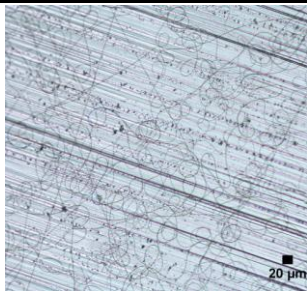
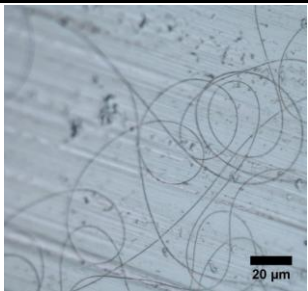
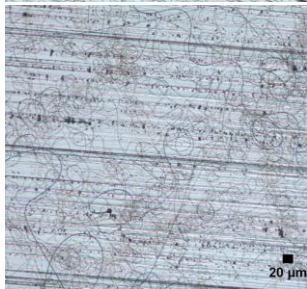
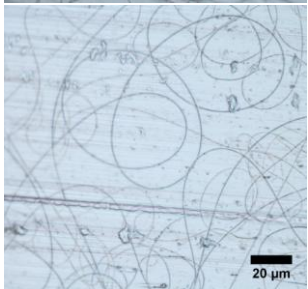
Estas imagens permitem verificar que a 100 rpm as fibras ainda não se encontram alinhadas, mas quando a velocidade é de 1000 rpm as fibras já se encontram paralelamente alinhadas. Foi esta a velocidade selecionada para a produção das matrizes de PCL de fibras alinhadas. Velocidades maiores conduzem à obtenção de fibras mais finas.

3.1.2 Matrizes de CS

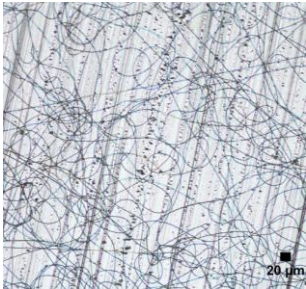
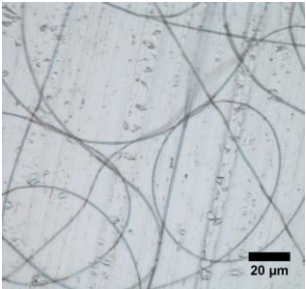
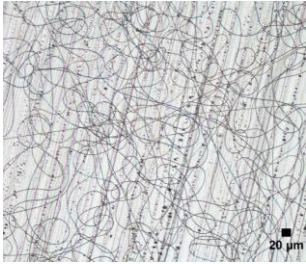
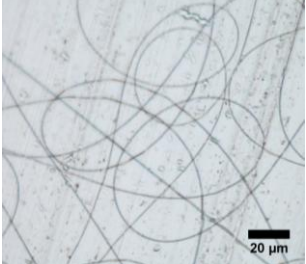
Para a fiação da solução polimérica de CS (1,8% CS, 0,4% PEO em ácido acético glacial 90% v/v), partiram-se das seguintes condições de referência: $V = 10$ kV, $\phi = 0,2$ ml/h e $d = 20$ cm. Com tensões abaixo de 6 kV forma-se uma gota de solução na ponta da agulha não sendo possível estabilizar o processo. O estudo da variação dos parâmetros relativamente aos de referência conduziu às seguintes conclusões, suportadas pelas imagens da Tabela 3.4:

- A 12 kV foram recolhidas fibras com menores diâmetros, provavelmente devido a uma maior quantidade de carga transportada pelo jato (a solução de CS é muito mais condutora que a de PCL) que estará na origem de um maior estiramento da fibra;
- Ao aumentar o caudal observou-se o aumento do diâmetro das fibras depositas;
- O aumento da distância agulha-coletor para 25 cm conduziu à diminuição dos diâmetros das fibras.

Tabela 3.4- Imagens de microscopia ótica das fibras produzidas a partir da solução de 1,8% CS e 0,4% de PEO para vários conjuntos de parâmetros de produção.

Parâmetros	Ampliação (100x)	Ampliação (500x)
$V = 10$ kV $\phi = 0,2$ ml/h $d = 20$ cm (padrão)		
$V = 12$ kV $\phi = 0,2$ ml/h $d = 20$ cm		

Continuação da Tabela 3.4-Imagens de microscopia ótica das fibras produzidas a partir da solução de 1,8% CS e 0,4% de PEO para vários conjuntos de parâmetros de produção.

Parâmetros	Ampliação (100x)	Ampliação (500x)
$V=10\text{ kV}$ $\phi=0,8\text{ ml/h}$ $d=20\text{ cm}$		
$V=10\text{ kV}$ $\phi=0,2\text{ ml/h}$ $d=25\text{cm}$		

O estudo do alinhamento das fibras de CS fiadas com os parâmetros de referência revelou um ténue alinhar das fibras para uma velocidade do coletor de 1200 rpm, como apresentado na Figura 3.1. O alinhamento é melhor quando o coletor atinge a sua máxima velocidade de rotação – 4000 rpm. Esta foi assim a velocidade de rotação escolhida para a produção de fibras “alinhadas”.

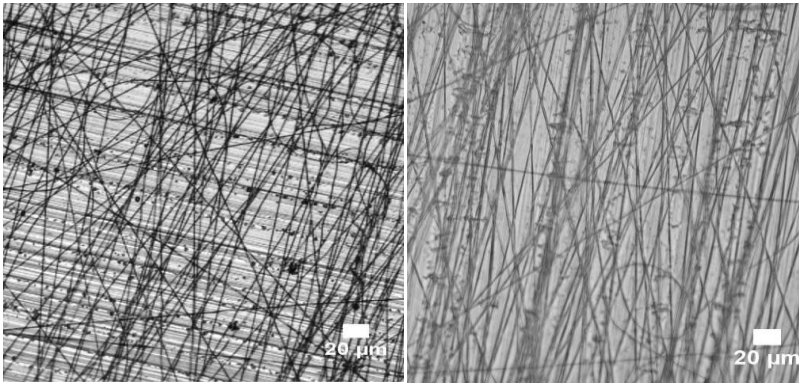


Figura 3.1- Imagens de microscopia ótica das fibras de CS produzidas no coletor rotatório, à esquerda a 1200 rpm e à direita a4000 rpm. Barra da escala: 20 µm.

3.1.3 Matrizes de gelatina de peixe

Para o apuramento dos parâmetros de electrofiação da solução de gelatina de peixe (25% de gelatina em ácido acético glacial 90% v/v) fez-se um estudo partindo dos seguintes parâmetros de referência: $V = 15\text{kV}$, $\phi = 0,3\text{ml/h}$; $d = 20\text{ cm}$. Com estes parâmetros, formou-se uma gota de solução polimérica na ponta da agulha, cujo volume vai aumentando até que a gota acabara por cair na base do sistema de fiação. No entanto, a partir das gotas, projeta-se um jato que é estirado enquanto viaja na direção do coletor. Ao tentar contrariar a formação da gota aumentando a tensão para 18 kV , irrompeu da ponta da agulha um jacto ramificado de fibras muito finas e o processo tornou-se instável. Com o mesmo propósito, diminuindo o caudal para $0,2\text{ ml/h}$ e aplicando uma tensão de $14\text{-}15\text{ kV}$ verificou-se uma produção estável de fibras. Variações entre a distância da agulha ao coletor não induziram diferenças significativas no diâmetro das fibras. Assim, adotou-se um caudal de $0,2\text{ ml/h}$ para a produção das fibras de GPx, deixando os outros parâmetros com os valores de referência. As imagens de microscopia ótica das fibras obtidas com este conjunto de parâmetros estão apresentadas na Figura 3.2.

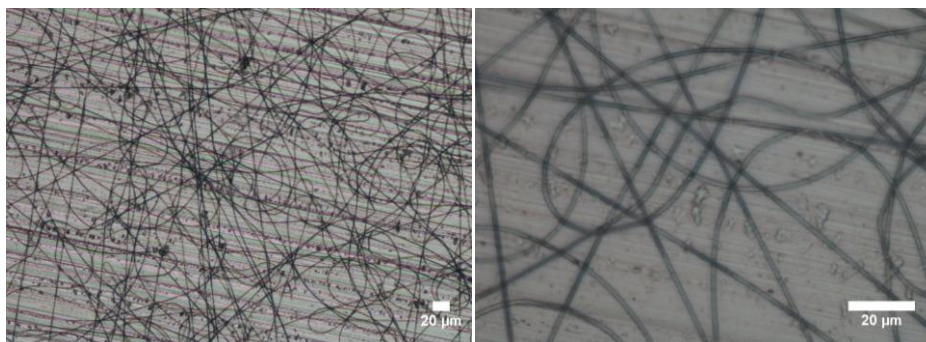


Figura 3.2- Imagens de microscopia ótica das fibras desalinhadas de GPx, produzidas a partir de uma solução de 25% numa solução aquosa de AAC a 90%, com $V=15\text{ kV}$, $\phi=0,2\text{ ml/h}$ e $d=20\text{ cm}$; à esquerda ampliação 100 x; à direita ampliação 500 x; Barra de escala: $20\text{ }\mu\text{m}$.

No coletor cilíndrico rotatório à sua máxima velocidade de rotação – 4000 rpm – foi possível obter um alinhamento parcial das fibras de GPx (Figura 3.3), mas foi necessário reduzir a tensão aplicada à agulha para 10 kV para que não ocorresse interrupção do jacto de solução polimérica.

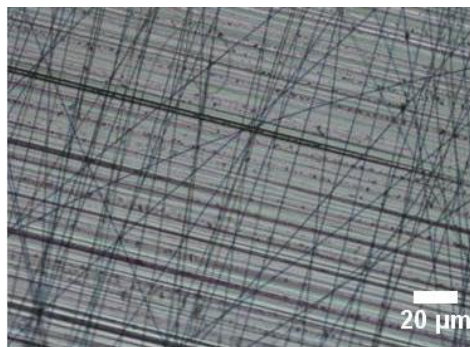


Figura 3.3- Imagem de microscopia ótica das fibras de GPx alinhadas a 4000 rpm, obtidas com uma ampliação de 100 x. Barra da escala: 20 μm .

Em culturas celulares foram usadas matrizes de GPx reticuladas por:

- DHT durante 72h a 140°C;
- Exposição a vapor de GTA, formado a partir de uma solução aquosa de GTA a 50%, durante 4h a 37°C;
- Exposição a vapor de GTA, formado a partir de uma solução aquosa de GTA a 5%, durante 4 e 6h a 37°C.

3.1.4 Matrizes de gelatina de porco

Os parâmetros de referência para a electrofiação da solução de gelatina de porco (20% de gelatina em ácido acético glacial 90% v/v) foram: $V = 15 \text{ kV}$, $\phi = 0,3 \text{ ml/h}$ e $d = 25 \text{ cm}$. Nestas condições, durante o processo ocorreram interrupções no jato. Assim, aumentou-se progressivamente o caudal até 0,7 ml/h. Nestas condições o jacto polimérico apresentou-se constante e estável, dando origem às fibras de GP documentadas na Figura 3.4. A variação da distância entre a agulha e o coletor não introduziu alterações significativas no diâmetro das fibras, como se mostra na mesma figura.

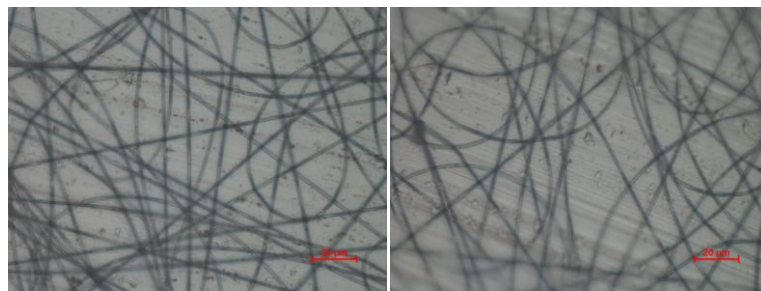


Figura 3.4- Imagem de microscopia ótica das fibras desalinhadas de GP produzidas com $V = 15$ kV, $\phi = 0,7$ ml/h e $d = 20$ cm (à esquerda) e $d = 25$ cm (à direita). Ampliação 500 x. Barra de escala: 20 μ m.

Em suma, para a produção de matrizes de fibras desalinhadas de GP fixaram-se os seguintes parâmetros de produção: $V = 15$ kV de tensão, $\phi = 0,7$ ml/h e $d = 25$ cm.

Na electrofiação das matrizes de fibras alinhadas de GP foi utilizada a máxima velocidade de rotação do coletor cilíndrico – 4000 rpm – e foi necessário diminuir a tensão aplicada para 13-14 kV devido à ocorrência de interrupções no jato. Ainda assim, as fibras obtidas revelaram algum desalinhamento, como se mostra na Figura 3.5.

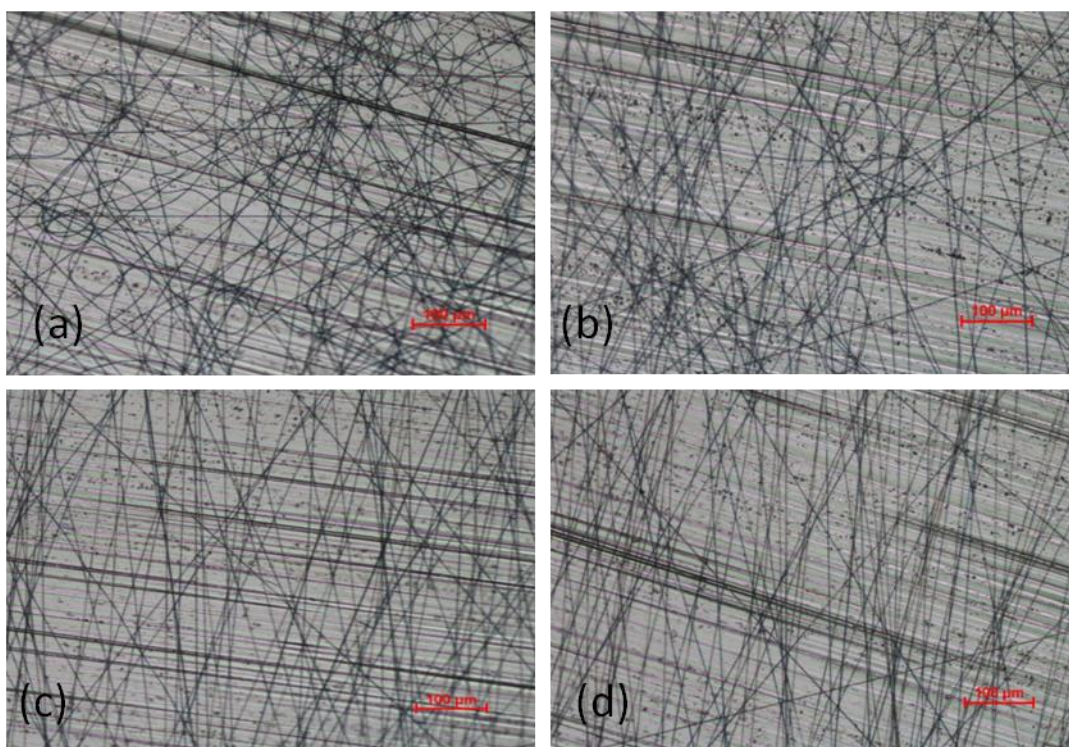


Figura 3.5- Imagens de microscopia ótica das fibras de GP obtidas no coletor cilíndrico rotatório com os parâmetros $V = 14$ kV; $\phi = 0,7$ ml/h e $d = 25$ cm a diferentes velocidades de rotação: (a) 700 rpm; (b) 1200 rpm; (c) 2000 rpm; (d) 4000 rpm.

Foram usadas em culturas celulares matrizes de GP reticuladas por:

- DHT durante 72h a 140°C;
- Exposição a vapor de GTA, formado a partir de uma solução aquosa de GTA a 50%, durante 4h a 37°C;
- Exposição a vapor de GTA, formado a partir de uma solução aquosa de GTA a 5%, durante 4 h a 37°C.

3.1.5 Matrizes de gelatina de bovino

Não havia experiência prévia no grupo de fiação da GB. Assim, testaram-se soluções desta gelatina dissolvida numa solução aquosa de AAC a 90 % v/v, em três concentrações diferentes: 16%, 20% e 25%. Partiu-se dos mesmos parâmetros de referência utilizados na electrofiação da GP: $V = 15$ kV, $\phi = 0,3$ ml/h e $d = 25$ cm.

Não foi possível fiar a solução de 16 % devido à ocorrência projeções de gotas na direção do coletor, acabando por dissolver as fibras já depositas. O aumentando da tensão aplicada até 20 kV não obviou esta situação.

Para a concentração de 20 %, a electrofiação com os parâmetros de referência deu origem a um jacto com interrupções, dando a percepção que o caudal debitado não era suficiente para a tensão aplicada. Assim, procedeu-se ao aumento do caudal para 0,7 ml/h, o que conduziu à formação de uma gota de solução na ponta da agulha. Com este caudal, o aumento da tensão para 17 kV conduziu a um processo estável e à obtenção das fibras apresentadas na figura 3.6.

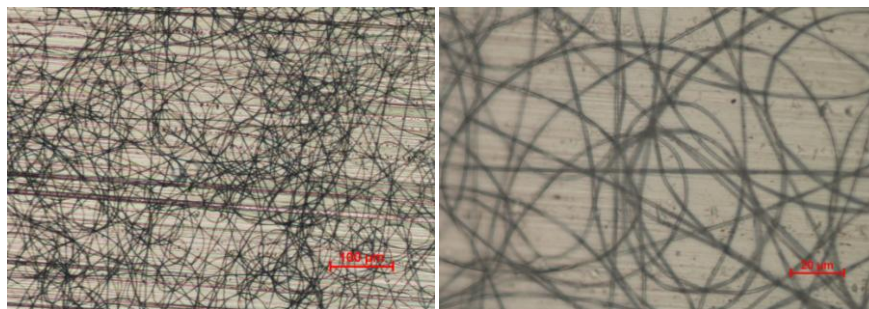


Figura 3.6- Imagens de microscopia ótica das fibras desalinhadas de GB, produzidas a partir da concentração de 20% em solução aquosa de AAC a 90% e, com os parâmetros de produção fixos em: $V = 17$ kV, $\phi = 0,7$ ml/h e $d = 25$ cm; à esquerda- Ampliação 100 x, barra de escala 100µm; à direita- 500 x, barra de escala 20 µm.

A solução e os parâmetros anteriores foram as condições selecionadas para a produção das matrizes de fibras desalinhadas de GB. A solução a 25% revelou-se demasiado concentrada, conduzindo à obtenção de fibras irregulares que se depositavam tipo “algodão”.

Para a produção das fibras alinhadas de GB, utilizou-se o coletor cilíndrico à sua máxima velocidade de rotação – 4000 rpm – tendo sido necessário ajustar a tensão aplicada para 14 kV, devido à ocorrência de interrupções no jato durante a fiação. A Figura 3.7 revela a presença de algumas fibras desalinhadas na deposição.

A maior facilidade em alinhar as fibras de PCL comparativamente às de CS e das várias gelatinas deve-se à menor condutividade da solução polimérica de PCL. Também a diferença nos diâmetros das fibras pode ser explicada por este facto.

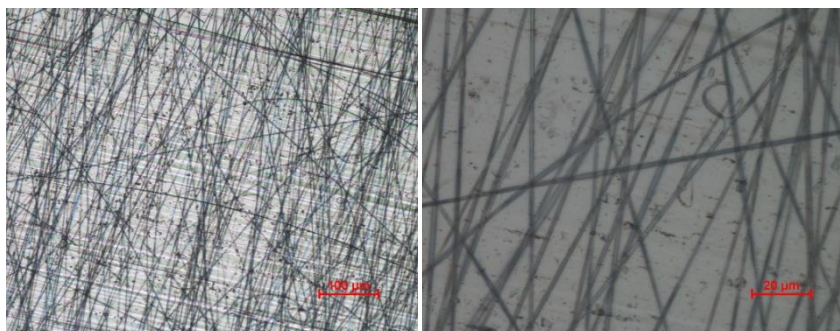


Figura 3.7- Imagens de microscopia ótica das fibras alinhadas de GB produzidas a partir da solução a 20% em solução aquosa de AAC a 90% v/v, com os parâmetros de produção fixos em $V = 14$ kV, $\phi = 0,7$ ml/h e $d = 25$ cm. (a) Ampliação 100 x, barra de escala 100µm; (b) 500 x, Barra de escala=20µm.

Usaram-se em culturas celulares matrizes de GB reticuladas por:

- DHT durante 72h a 140°C;
- Exposição a vapor de GTA, formado a partir de uma solução de GTA a 50%, durante 4h a 37°C;
- Exposição a vapor de GTA, formado a partir de uma solução de GTA a 5%, durante 4h a 37°C.

3.1.6 Resumo dos parâmetros de produção

Segue na Tabela 3.5 o resumo dos parâmetros otimizados para a produção de matrizes alinhadas e desalinhadas para os diferentes materiais.

Tabela 3.5- Resumo dos parâmetros de produção das matrizes poliméricas de fibras alinhadas e desalinhadas.

Materiais	Alinhamento	Tensão (kV)	Caudal (ml/h)	Distância agulha-coletor (cm)
PCL	Desalinhadas	13	0,5	20
CS		10	0,2	20
GPx		14-15	0,2	20
GP		15	0,7	25
GB		17	0,7	25
PCL	Alinhadas	13	0,5	20
CS		10	0,2	20
GPx		10	0,2	20
GP		13-14	0,7	25
GB		14	0,7	25

Na Tabela 3.6 resumem-se os processos de reticulação realizados nos diversos materiais.

Tabela 3.6- Processos de reticulação realizados nos materiais.

Materiais	DHT 140°C	GTA 50%	GTA 5%
CS	72h	-	-
	144h	-	-
GPx	72h	4h	4h; 6h
GP	72h	4h	4h
GB	72h	4h	4h

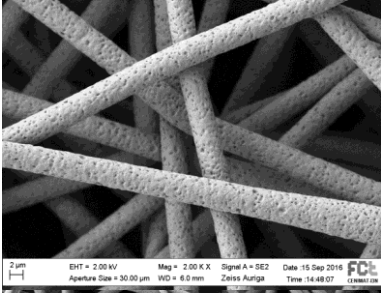
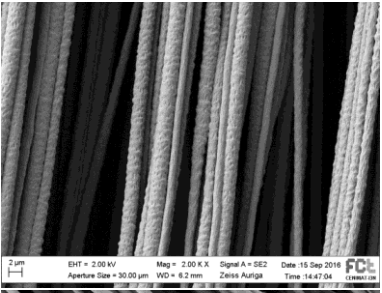
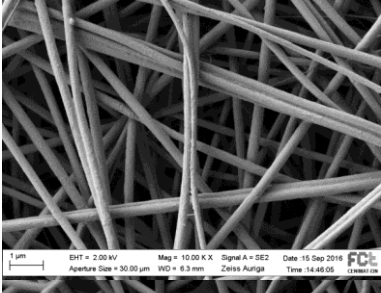
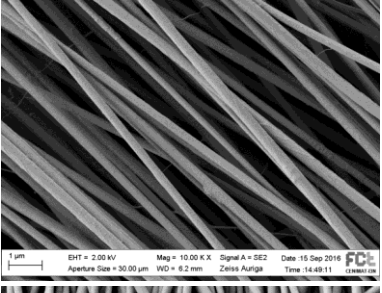
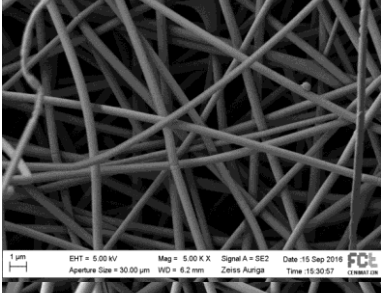
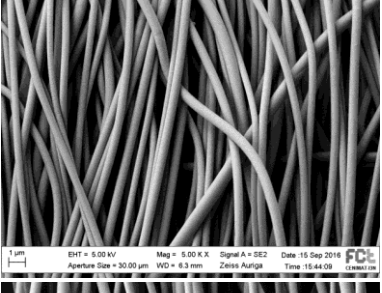
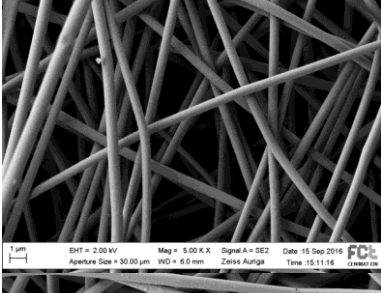
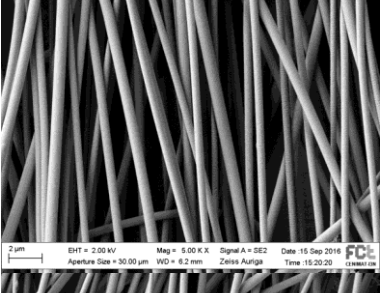
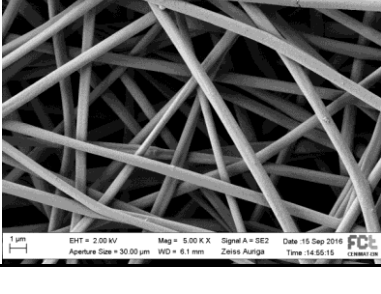
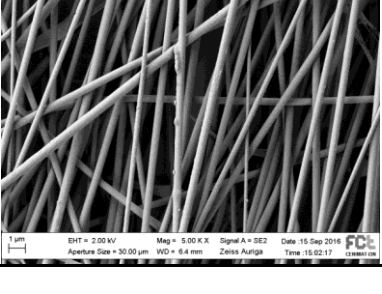
3.2 Caraterização das matrizes

Através das imagens obtidas via SEM, foi possível observar as fibras com maior pormenor e precisão, aferindo sobre a sua morfologia, diâmetro, grau de alinhamento e efeito induzido pelos processos reticulação. Efetuaram-se também testes de perda de massa e ensaios de ninidrina para avaliar o grau de reticulação das mostras. Através da análise de FTIR averiguou-se eventuais modificações na estrutura química dos compostos e testaram-se mecanicamente as matrizes produzidas através de testes de tração.

3.2.1 Morfologia

De um modo geral, todas as matrizes produzidas (não reticuladas) apresentaram uniformidade na sua morfologia, sem contas nem pontos de fusão, como é possível observar na Tabela 3.7.

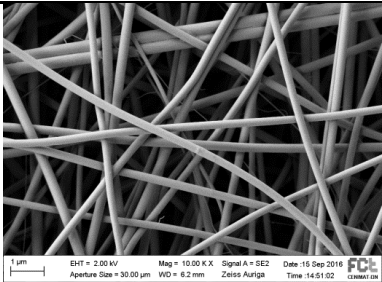
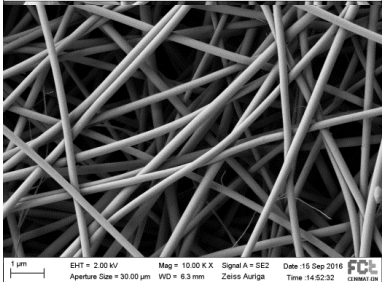
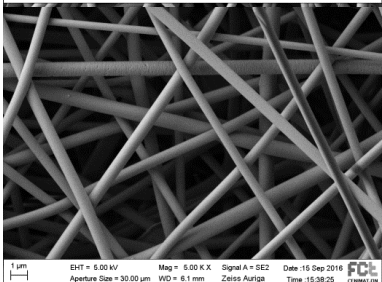
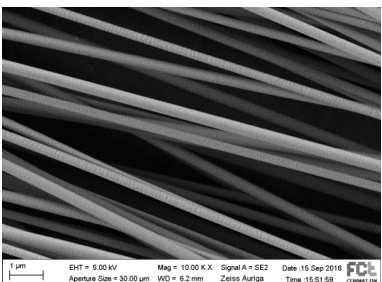
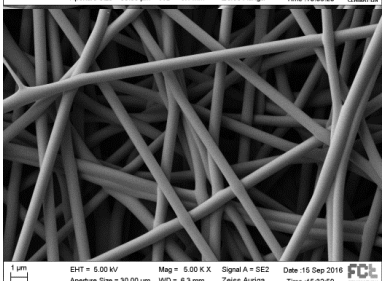
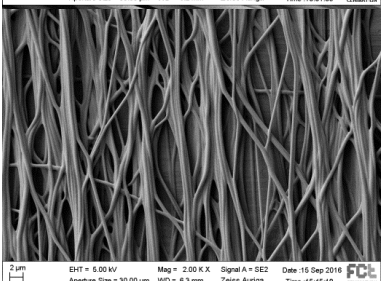
Tabela 3.7- Imagens de SEM das matrizes de fibras.

	Matriz desalinhada	Matriz alinhada
PCL		
CS		
Gelatina de Peixe		
Gelatina de Porco		
Gelatina de bovino		

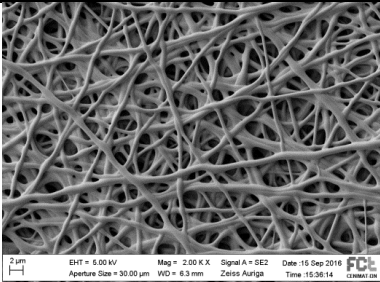
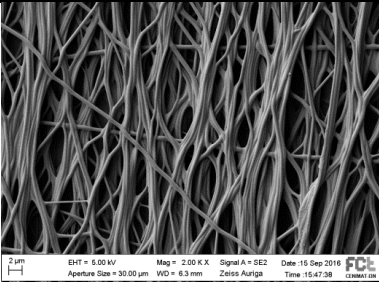
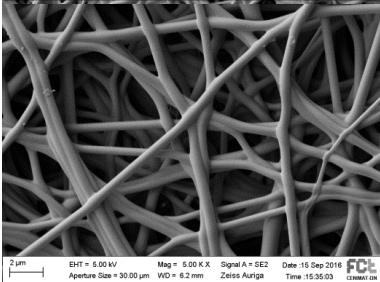
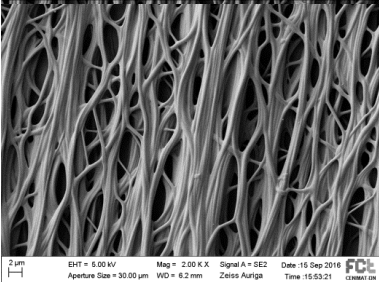
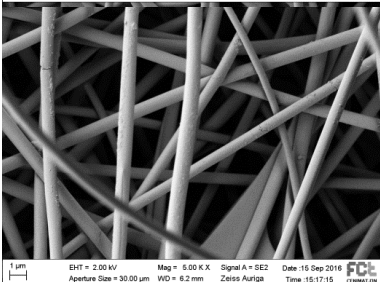
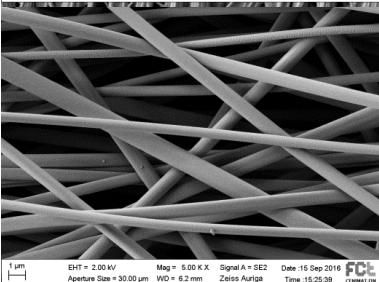
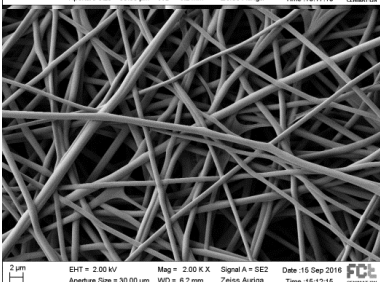
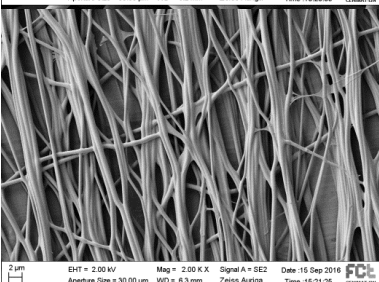
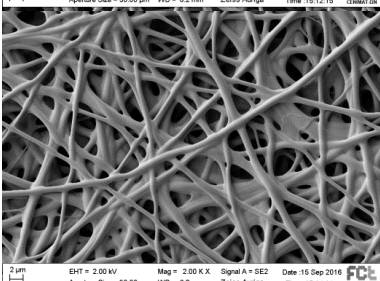
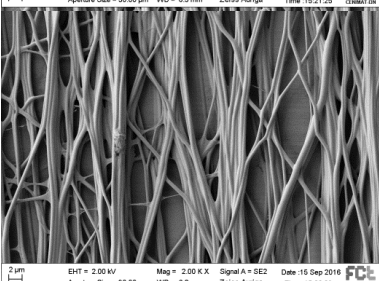
Dado que os processos de reticulação são passíveis de induzir alterações morfológicas nas fibras, as suas estruturas foram também analisadas através das imagens de SEM, presentes na Tabela 3.8.

A reticulação por DHT não suscitou alterações na morfologia das fibras, facto comprovado por outros estudos [74, 80]. Contrariamente, o GTA originou fusão parcial das fibras, devido à água presente na fase de vapor durante o desenrolar do processo [40, 68]. Esta fusão foi mais evidente nas matrizes reticuladas com GTA 5% devido à maior percentagem de água.

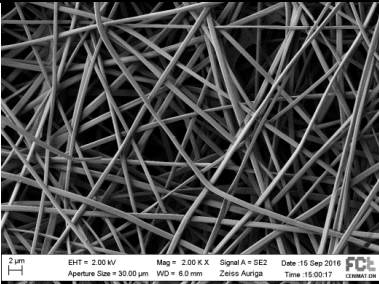
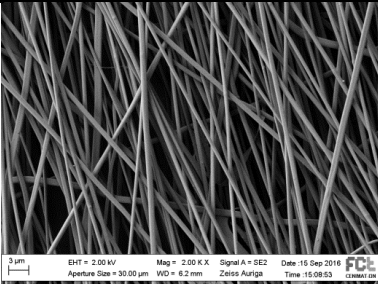
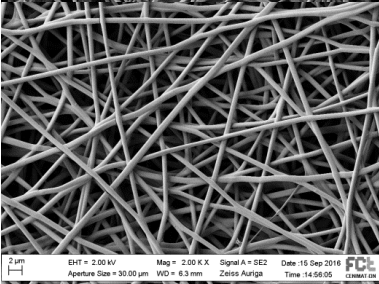
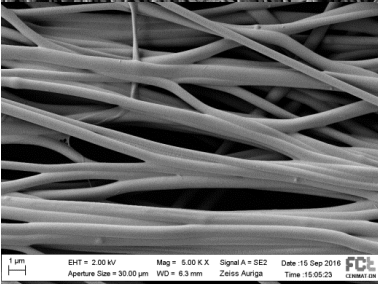
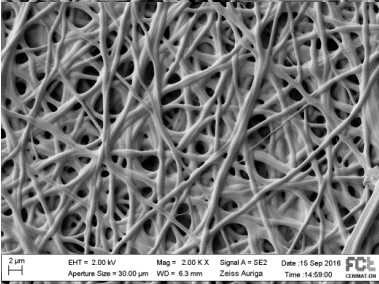
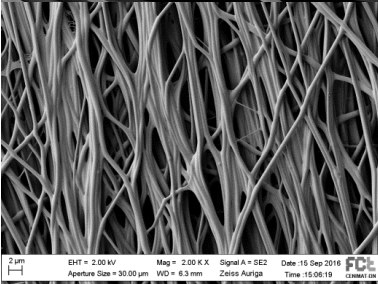
Tabela 3.8- Morfologias das fibras das matrizes produzidas após os processos de reticulação.

	Matrizes desalinhas	Matrizes alinhadas
CS DHT 72h		-
CS DHT 144h		-
GPx DHT		
GPx GTA 50% 4h		

Continuação da Tabela 3.8- Morfologias das fibras das matrizes produzidas após os processos de reticulação.

	Matrizes desalinhas	Matrizes alinhadas
GPx GTA 5% 4h		
GPx GTA 5% 6h		
GP DHT		
GP GTA 50% 4h		
GP GTA 5% 4h		

Continuação da Tabela 3.8- Morfologias das fibras das matrizes produzidas após os processos de reticulação.

	Matrizes desalinhasdas	Matrizes alinhadas
GB DHT		
GB GTA 50% 4h		
GB GTA 5% 4h		

3.2.2 Diâmetro

Na Tabela 3.9 apresentam-se os diâmetros médios das fibras de cada matriz alinhada e desalinhada sem reticulação. Visto que os processos de DHT não alteraram a morfologia das fibras, os seus diâmetros irão ser coincidentes com os das matrizes não reticuladas, e por esse motivo não foram calculados. Como o glutaraldeído induz a alteração e a fusão das fibras, por vezes fica impercetível situar as suas extremidades, impossibilitando os cálculos dos seus diâmetros.

Tabela 3.9-Diâmetros médios (\bar{d}) das fibras alinhadas e desalinhadas (n=50) dos diferentes materiais (não reticulados) e o respetivo desvio-padrão da média (σ).

Matrizes	$\bar{d} \pm \sigma$ (nm)
PCL desalinhado	3770 \pm 470
PCL alinhado	1780 \pm 510
CS desalinhado	230 \pm 40
CS alinhado	240 \pm 50
GPx desalinhado	580 \pm 100
GPx alinhado	440 \pm 120
GP desalinhado	570 \pm 110
GP alinhado	470 \pm 120
GB desalinhado	630 \pm 100
GB alinhado	370 \pm 80

Através da análise dos diâmetros é possível constatar que as fibras alinhadas de PCL possuem metade do diâmetro das fibras desalinhadas, devido ao elevado estiramento sofrido através da rotação do coletor, durante o processo de electrofiação. É notório também que a PCL apresenta valores diametrais discrepantes em relação aos restantes materiais. Este facto pode ser justificado atendendo à utilização do solvente clorofórmio para a dissolução do mesmo, o que não acontece com os outros polímeros. O clorofórmio é um solvente que possui baixa condutividade, responsável por um menor estiramento do jacto de solução, e consequente aumento de diâmetro.

Todas as matrizes de gelatina desalinhadas apresentam diâmetros superiores em relação às suas matrizes alinhadas, porque foram produzidas com valores de tensão maiores. Isto quer dizer que, a tensões maiores ocorreu um aumento da aceleração do jacto em direção ao coletor, levando a um menor estiramento das fibras. O mesmo não se verifica no caso do CS, dado que os seus diâmetros em fibras alinhadas e desalinhadas são muito semelhantes.

3.2.3 Alinhamento

Neste estudo, o alinhamento das fibras é muito importante, porque um dos seus principais objetivos é avaliar a diferenciação de células neuronais ao longo das fibras alinhadas.

Nas figuras 3.8 a 3.12 podem observar-se as imagens de SEM das fibras alinhadas e o respetivo histograma de medição dos ângulos, com a sua média e desvio padrão. É possível analisar que as fibras de PCL alinham facilmente, mesmo a uma baixa velocidade de rotação (1000 rpm), originando um bom grau de alinhamento. No entanto, o CS e as gelatinas apresentam um grau de alinhamento mais baixo, possivelmente devido à sua elevada condutividade, que provoca uma elevada repulsão das cargas e um movimento caótico até atingirem o coletor, originando uma maior dispersão. Através dos histogramas é possível verificar que os ângulos medidos apresentam distribuição normal como o esperado.

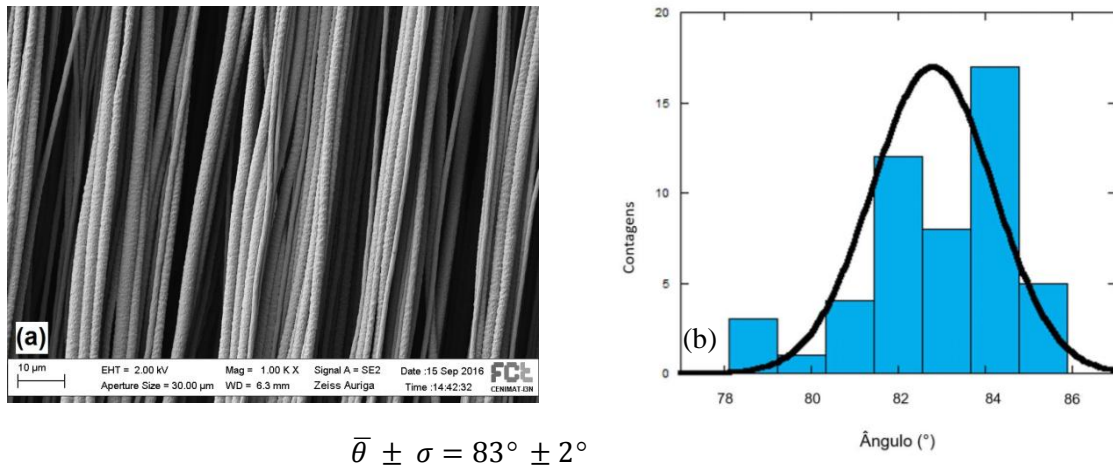
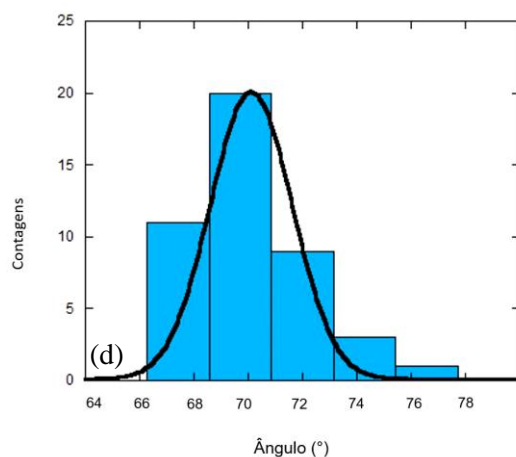
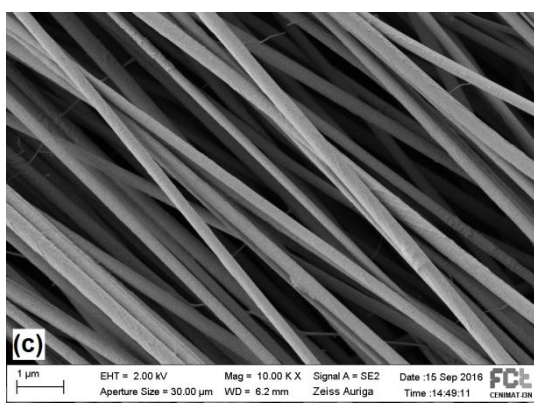
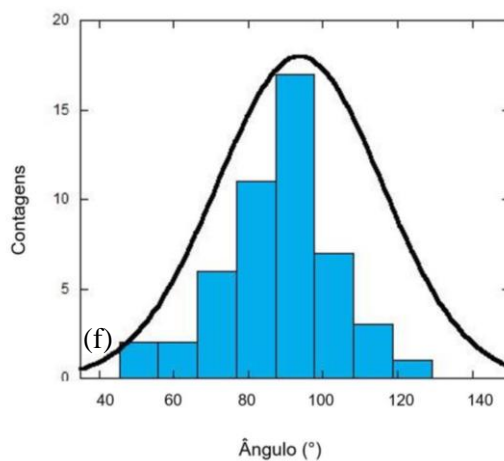
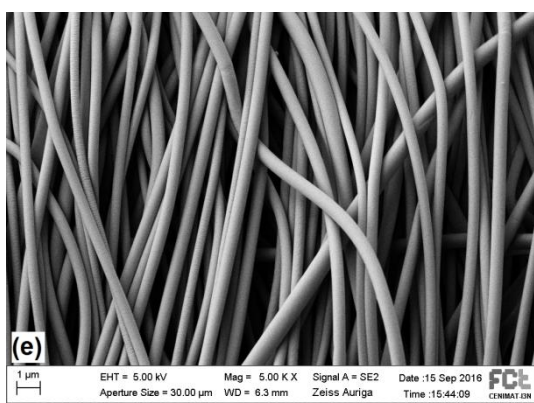


Figura 3.8- Imagem de SEM da matriz alinhada de PCL produzida a 1000 rpm (a) e, o respetivo histograma com curva de normalização (b), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.



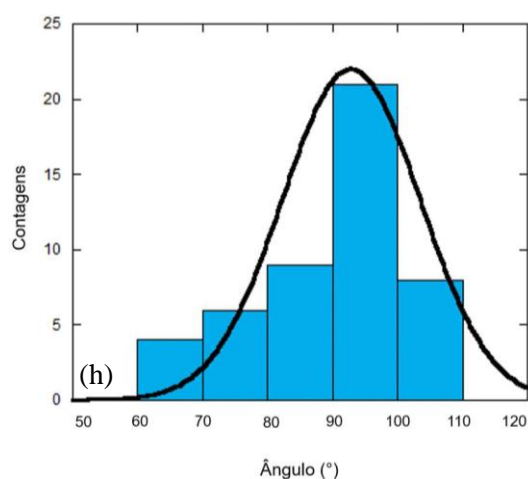
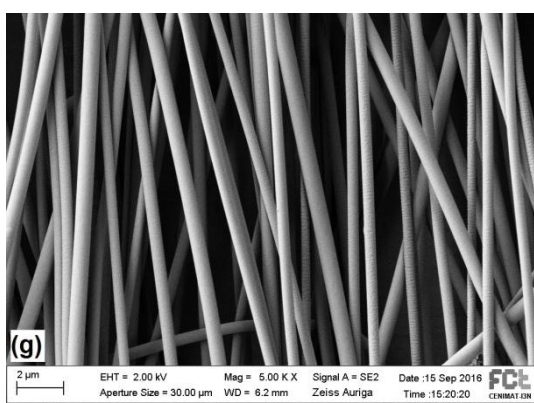
$$\bar{\theta} \pm \sigma = 71^\circ \pm 9$$

Figura 3.9- Imagem de SEM da matriz alinhada de CS produzida a 4000 rpm (c) e, o respectivo histograma com curva de normalização (d), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.



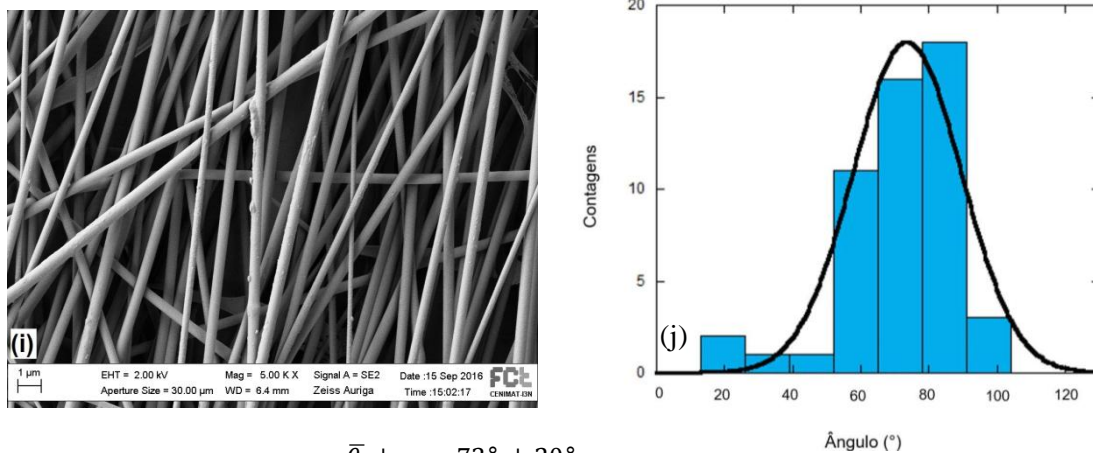
$$\bar{\theta} \pm \sigma = 87^\circ \pm 18^\circ$$

Figura 3.10- Imagem de SEM da matriz alinhada de GPx produzida a 4000 rpm (e) e, o respectivo histograma com curva de normalização (f), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.



$$\bar{\theta} \pm \sigma = 89^\circ \pm 14^\circ$$

Figura 3.11- Imagem de SEM da matriz alinhada de GP produzida a 4000 rpm (g) e, o respectivo histograma com curva de normalização (h), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.



$$\bar{\theta} \pm \sigma = 73^\circ \pm 20^\circ$$

Figura 3.12- Imagem de SEM da matriz alinhada de GB produzida a 4000 rpm (i) e, o respectivo histograma com curva de normalização (j), relativo à medição dos ângulos de alinhamento das fibras.

3.2.4 Perda de massa

A perda de massa é indicativa da eficácia dos processos de reticulação, e esta pode variar com o tempo que se submete cada matriz ao processo de reticulação.

Numa primeira fase, realizaram-se testes de perda de massa por imersão de 4 amostras de matrizes de gelatina reticuladas por DHT durante 72h a 140°C e expostas a vapor de uma solução aquosa de GTA a 50% durante 2, 4 e 6h, em água à temperatura ambiente. Os resultados estão indicados na Figura 3.13.

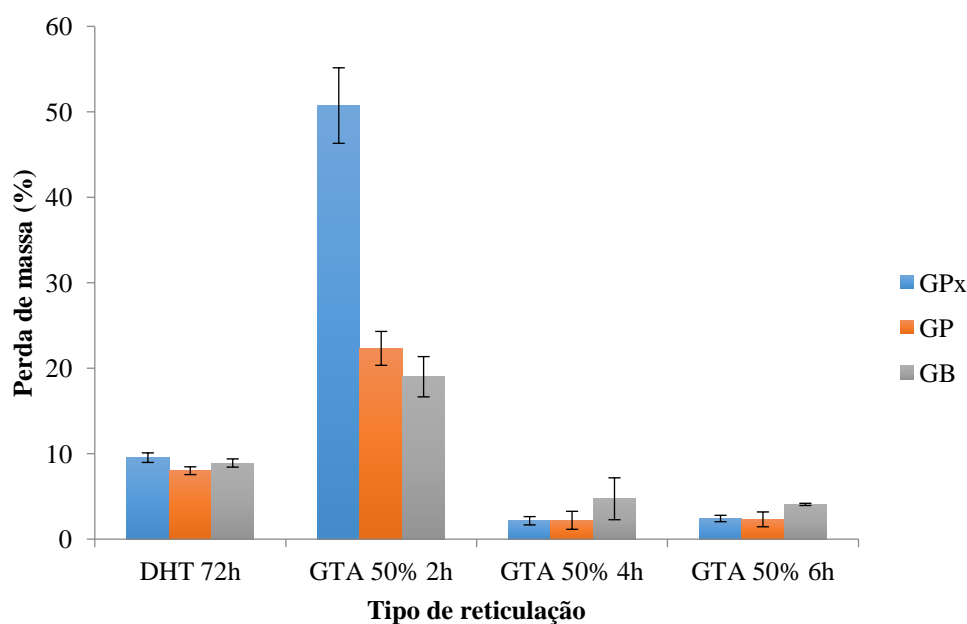


Figura 3.13- Perda de massa (%) das diferentes gelatinas, reticuladas por DHT e por exposição a vapor de uma solução aquosa de GTA a 50% 2, 4 e 6h, quando imersas em água à temperatura ambiente.

Os resultados revelaram uma perda de massa muito elevada para um tempo de reticulação de 2h, em particular, a GPx apresentou uma fração de massa perdida superior a 50%. Este valor mais elevado para esta gelatina justifica-se pelo facto de ser a única das três gelatinas usadas que se dissolve completamente em água fria. Assim, fixou-se as 4h como o tempo de reticulação mínimo para exposição das matrizes ao vapor da solução aquosa de GTA a 50%.

Sabe-se que a reticulação com GTA pode introduzir alguma citotoxicidade no material devido à presença de grupos aldeído não reagidos. Com o objetivo de poder vir a tornar as matrizes menos tóxicas, testou-se a reticulação das matrizes de gelatina por exposição a vapor de uma solução aquosa de GTA a 5% durante 4 e 6h, em água a 37°C (temperatura que mimetiza as condições *in vivo*). Repetiram-se também a esta temperatura os testes com a solução de GTA a 50% para as 4h de reticulação. Os resultados estão apresentados na Figura 3.14.

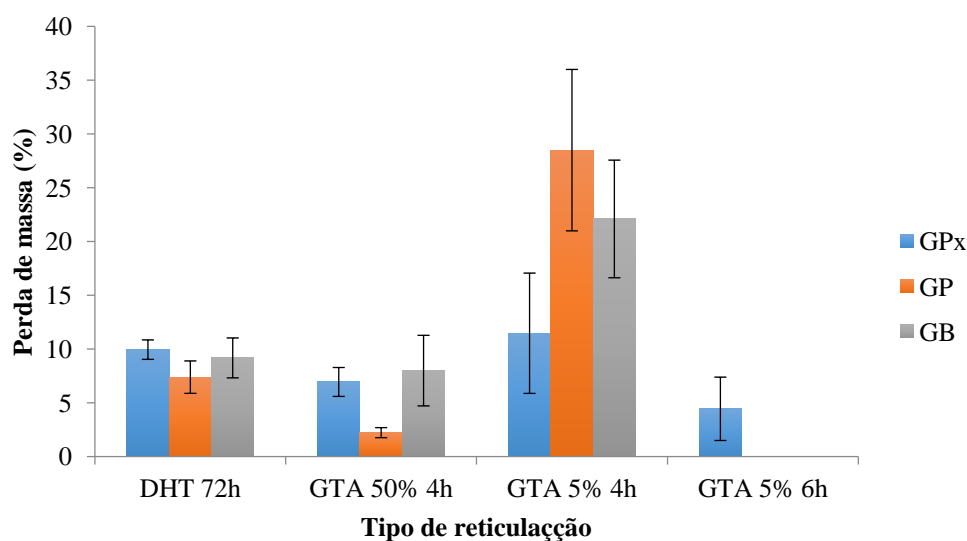


Figura 3.14- Perda de massa (%) em água a 37°C das diferentes gelatinas reticuladas por DHT e GTA 5% e 50 %.

A análise da Figura 3.14 permite confirmar que a reticulação das matrizes de gelatina por DHT e por exposição ao vapor das soluções de GTA a 5% e a 50% durante 6 e 4h, respetivamente, é eficaz traduzindo-se por perdas de massa entre os 3 e os 13%. Nestas condições deverão estabelecer-se ligações intermoleculares em número suficiente para a estabilização da matriz quando exposta a meios aquosos. As matrizes reticuladas com recurso à solução de GTA a 5% durante 4h apresentam perdas de massa superiores às restantes condições (chegando a ser de 37%), ocorrendo uma tendência das matrizes encolherem significativamente durante o processo.

Todas as condições testadas nestes últimos ensaios de perda de massa foram utilizadas para reticular as amostras empregues nos testes *in vitro*.

3.2.5 Ensaio de ninidrina

Os ensaios de ninidrina permitem avaliar o grau de reticulação das matrizes de diferentes gelatinas pela determinação do rácio entre grupos amina reagidos nas amostras reticuladas e grupos aminas disponíveis para reação nas amostras não reticuladas, pois a ninidrina reage com as aminas livres formando um composto púrpura (púrpura de *Ruhemann*). É a partir de medidas de absorvância a um comprimento de onda característico desse composto (570 nm) que se infere o referido rácio, que obedece à Lei de *Lambert Beer*.

Neste sentido foram preparadas soluções de gelatinas (não reticulada) em água, com diferentes concentrações. Os testes foram realizados em triplicado. A estas soluções adicionou-se a solução de ninidrina como descrito na secção de materiais e métodos e no Anexo 2. Após o tempo de reação foi lida a absorvância das soluções a 570 nm. A partir destes resultados traçaram-se as retas de correlação entre a concentração das soluções, $[c]$, e a absorvância, Abs , correspondente à quantidade de composto formado após o tempo de reação com a ninidrina (ver equação 2.2 da secção dos materiais e métodos). As retas, $Abs = m[c] + b$ obtidas estão representadas na Figura 3.15 e na Tabela 3.10, onde se indicam os respetivos parâmetros.

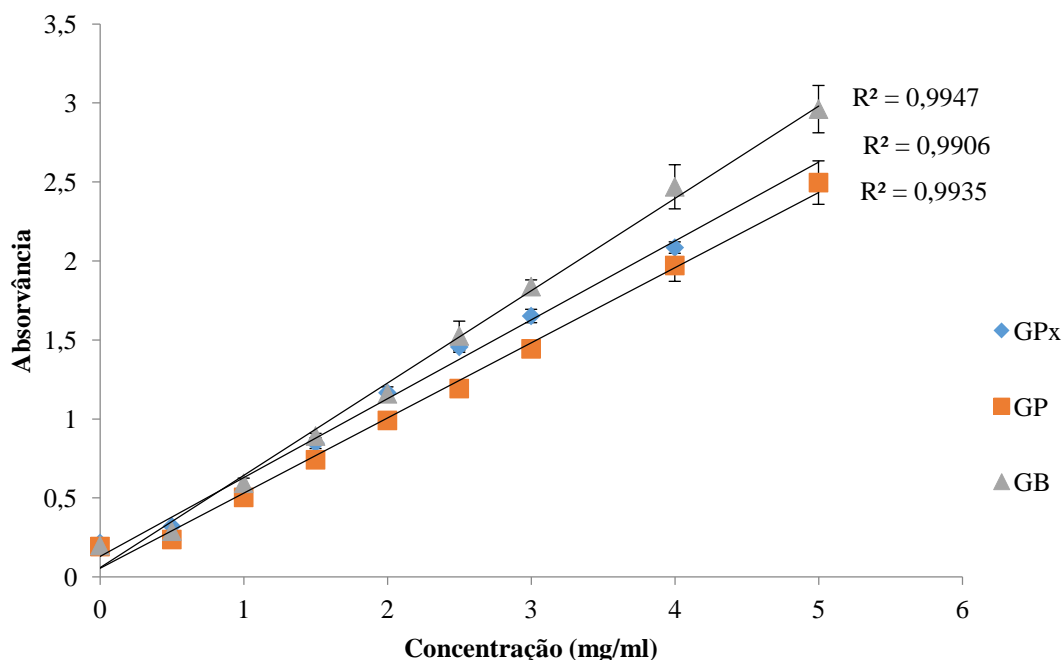


Figura 3.15- Retas de correlação entre a concentração de soluções de gelatina e a absorvância a 570 nm, lida após reação da ninidrina com grupos amina presentes nessas soluções. Os valores para cada concentração correspondem à média de réplicas ($n=3$) e a barra de incerteza ao desvio padrão da média.

Tabela 3.10- Retas de calibração para cada gelatina reagida com ninidrina.

Materiais	Equação linear da reta de correlação
GPx	$Abs = 0,4994[c] + 0,1295$
GP	$Abs = 0,4757[c] + 0,0544$
GB	$Abs = 0,5844[c] + 0,0586$

Seguidamente, conduziu-se o teste da ninidrina com 5 mg de cada uma das matrizes de gelatina reticuladas por DHT ou GTA, como descrito na secção de materiais e métodos, e a partir das absorvâncias medidas após o tempo de reticulação. A cor desta reação foi mais uma vez aferida pelo espectrofotómetro, traduzindo-se num valor de absorvância, A_r . A partir deste valor e da equação da reta de correlação correspondente à gelatina em causa, foi determinada através da expressão 2.3 o grau de reticulação. Os resultados apresentam-se na Tabela 3.11.

Tabela 3.11- Grau de reticulação de cada gelatina (%), resultante dos vários processos de reticulação aplicados, avaliado pela média ($n=3$) da fração de aminas reagidas durante o processo, com o desvio padrão da média.

Processos de reticulação	GPx	GP	GB
DHT	41±0,0674	43±0,0405	57±0,0405
GTA 50% 4h	94±0,0079	63±0,0207	68±0,0315
GTA 5% 4h	42±0,0405	37±0,0553	56±0,0310
GTA 5% 6h	91±0,0089	-	-

Os resultados dos testes de ninidrina evidenciam que o grau de reticulação de gelatina exposta a vapor de uma solução aquosa de GTA a 5% é dependente do tempo a que estas são expostas ao tratamento, já que quando o tratamento da gelatina de peixe aumentou de 4 para 6h, o grau de reticulação aumentou de 42% para 91%. Este resultado é consistente com o dos testes de perda de massa. As diferenças dos graus de reticulação das várias gelatinas quando sujeitas ao mesmo tratamento podem ser devidas a diferenças entre as suas estruturas moleculares – neste estudo usaram-se gelatinas do tipo A (peixe e porco) e do tipo B (bovino) [81] que detêm um teor diferente de grupos amina livres disponíveis para reagir com o GTA e, consequentemente, atingirem graus de reticulação diferentes [81].

Nas matrizes reticuladas por DHT, os graus de reticulação resultantes dos ensaios de ninidrina não estão em concordância com os resultados obtidos nos testes de perda de massa, se isso não acontecesse, poderiam supor-se perdas de massa superiores às observadas. Este facto explica-se devido à reticulação envolver outros grupos que não as aminas, nomeadamente a reação de condensação entre os grupos carboxilo ($C(=O)OH$) com os grupos amina (NH_2). Durante esta reação os grupos NH_2 são convertidos em NH (amidas secundárias) [15, 65]. Dado que a reação de ninidrina é estabilizada por amoníaco (NH_3), e que os grupos NH e NH_2 são deriva-

dos do amoníaco, poderá ocorrer uma eventual reação secundária, na qual o rendimento de formação do composto de cor púrpura não irá ser controlado cineticamente, formando-se quantidades variáveis deste produto [6].

3.2.6 Ensaios de tração

Através dos dados de tensão versus deformação, obtidos nos ensaios de tração, foi possível calcular o módulo de *Young* de cada matriz de acordo com a metodologia apresentada na secção de materiais e métodos. Esses resultados apresentam-se na Tabela 3.12.

Tabela 3.12- Médias do módulo de *Young* das matrizes de PCL, CS, GPx, GP e GB reticuladas por DHT e GTA.

Materiais	Processos de reticulação	<i>E</i> (MPa)
PCL	-	$9,0 \pm 1,1$
CS	-	$18,3 \pm 2,9$
GPx		$0,2 \pm 0,1$
GP	DHT	$0,4 \pm 0,1$
GB		$0,3 \pm 0,1$
GPx		$1,0 \pm 0,3$
GP	GTA 50% 4h	$1,1 \pm 0,4$
GB		$1,0 \pm 0,2$

O PCL registou em módulo de *Young* cerca de $9,0 \pm 1,1$ MPa, e curvas de tração como a que se apresenta como exemplo na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.**

As curvas de tração típicas do CS e das gelatinas (materiais testados e hidratados) apresentam-se na Figura 3.17. As gelatinas de diferentes origens apresentarem curvas de tração semelhantes pelo que só se apresenta como exemplo curvas correspondentes à GPx. O CS foi o polímero que apresentou maior módulo de *Young*, indicando que é o material mais rígido utilizado neste trabalho. Num estudo realizado por Gomes, S.R., *et al.* 2015, as membrans de CS produzidas a partir de uma solução aquosa de AAC, apresentaram rigidez superior, com $E=38 \pm$

10 MPa[7], sendo que as medições foram efetuadas utilizando matrizes secas, enquanto que neste trabalho as matrizes testadas foram humedecidas. A água diminui a interação entre as cadeias, tornando mais fácil o deslizamento das mesmas quando sujeitas a uma força externa, diminuindo o módulo de *Young*.

As matrizes de gelatina apresentaram curvas de tração típicas de um material elástico, dado que a sua deformação ocorre somente na zona elástica. As membranas reticuladas por GTA revelam maior rigidez que as submetidas ao processo de DHT. Estas ocorrências talvez possam ser devidas às ligações covalentes inter e intramoleculares estabelecidas durante o processo de GTA, ocasionando matrizes menos dúcteis.

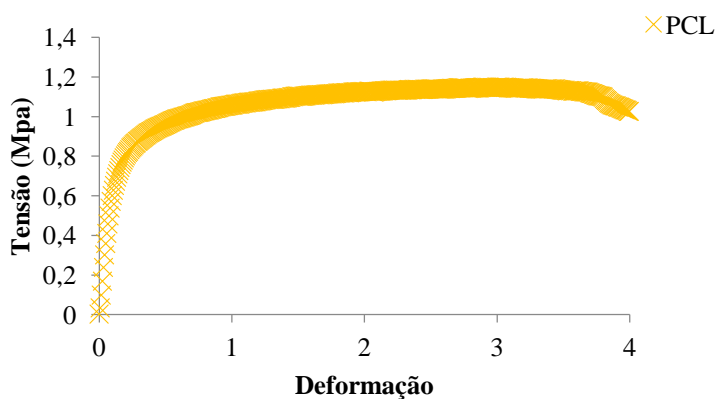


Figura 3.16- Curva de tração de uma amostra de PCL, representativa do conjunto de réplicas testadas, obtida a uma velocidade de 2 mm/min.

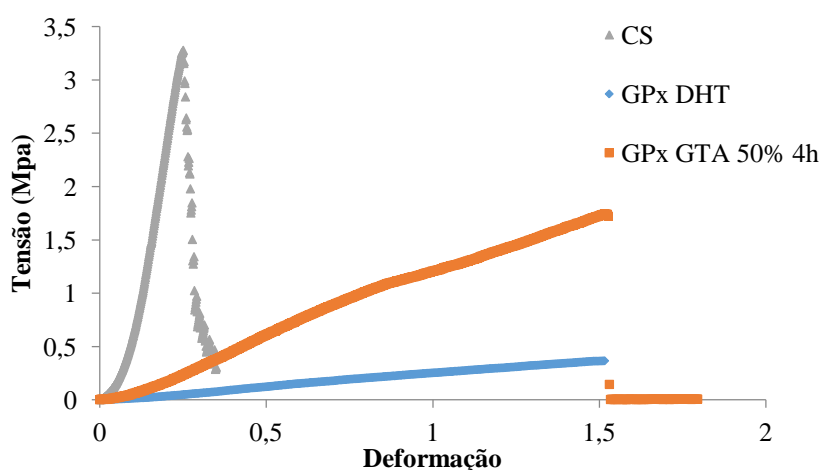


Figura 3.17- Curvas de tração representativas do comportamento das matrizes de CS e gelatinas humedecidas, obtidas a uma velocidade de 1 mm/min.

3.2.7 ATR-FTIR

A técnica de FTIR foi utilizada para identificar eventuais alterações químicas causadas pelos processos de reticulação nas gelatinas. Como veremos mais adiante, na perspectiva de proporcionar uma melhor interação do CS com as células, procedeu-se à reticulação das amostras colocando-as numa estufa à temperatura de 140°C durante 72h e 144 h, para que ocorresse um processo de DHT semelhante àquele a que se submeteram as matrizes de gelatina mas sem que fosse feito vácuo. As amostras não reticuladas e reticuladas também foram alvo de análise de FTIR. Nas tabelas 3.13 e 3.14

Tabela 3.14 encontram-se resumidas as principais bandas de absorção no infravermelho característico do CS e da gelatina, respetivamente.

Tabela 3.13-Principais bandas de absorção do CS no infravermelho.

Número de onda (cm ⁻¹)	Descrição	Referência
1155-1132	Estrutura polisacarídica	[82]
1380,1316,1255	Deformação de C-CH ₃ (Amida III)	[82]
1592	Estiramento N-H (Amida II)	[82]
1654	Estiramento das ligações C=O (Amida I)	[82]
2800-2900	Estiramento das vias ligações CH ₂	[82]
3400-3100	Estiramento das ligações N-H e O-H	[83]

Tabela 3.14-Principais bandas de absorção da gelatina do infravermelho.

Número de onda (cm ⁻¹)	Descrição	Referência
1240	Estiramento C-N em fase e deformação angular N-H (Amida III)	[84]
1542-1544	Deformação angular N-H (Amida II) Estiramento C-N	[84]
1636-1640	Estiramento C=O (Amida I)	[84]
3300	Estiramento das vibrações N-H (Amida A)	[67, 84]
3100	Estiramento das vibrações N-H (Amida B)	[85]

A Figura 3.18 exibe os espectros de FTIR obtidos para o CS não reticulado e reticulado por DHT. As bandas exibidas pelo CS reticulado são semelhantes às características do CS (ver Tabela 3.13), exceto na proporção entre os picos correspondentes às amidas I e II (1592-1654 cm^{-1}), onde ocorreu uma inversão de intensidades. Isto pode dever-se à conversão de amins livres (NH_2) em amidas secundárias (NH) que ocorre durante a reação de condensação entre os grupos carboxilo ($\text{C}(=\text{O})\text{OH}$) e grupos amina (NH_2) [86].

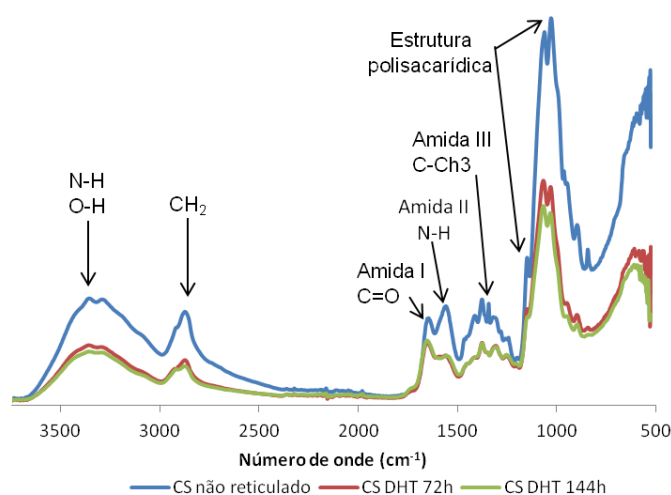


Figura 3.18- Espectro de FTIR do CS não reticulado e reticulado por DHT 72h e 144h a 140°C.

A Figura 3.19 mostra os espectros de FTIR para as gelatinas de peixe, porco e bovino não reticuladas. As principais bandas típicas da gelatina (ver Tabela 3.14) estão presentes em todos os espectros. Destaca-se a presença da banda entre 1400 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} que pode sofrer alterações devido à formação de ligações aldimina ($\text{HC}=\text{N}$) associadas à reação de reticulação com o GTA [84].

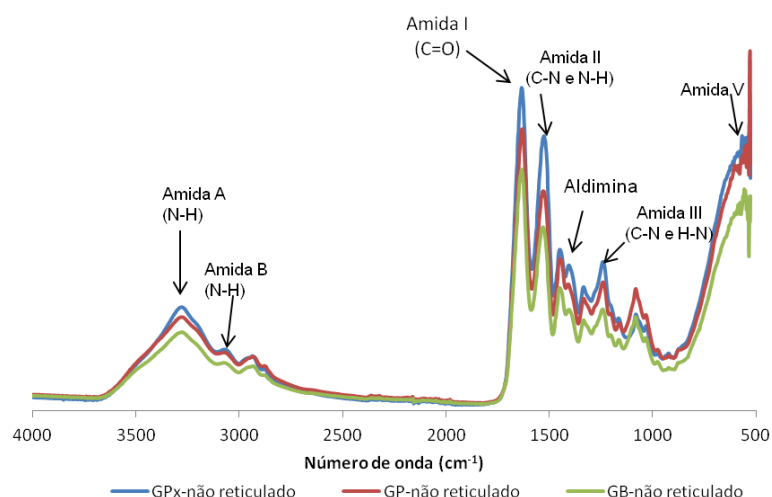


Figura 3.19- Espectro de FTIR das diferentes gelatinas não reticuladas

Ao comparar os espectros das gelatinas não reticuladas e reticuladas tanto por DHT como por GTA (Figura 3.20 a Figura 3.22), verificamos que não ocorre o aparecimento de novos picos, significando que a estrutura química não foi afetada pelos processos de reticulação. No entanto, algumas alterações na forma das bandas entre 1400 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} e entre 1540 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} poderão ter ocorrido na sequência das reações de reticulação por exposição a GTA e ao processo DHT, respetivamente.

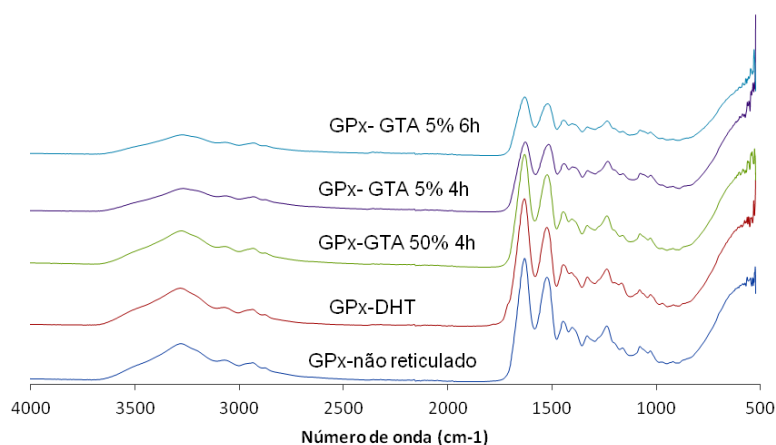


Figura 3.20- Espectros FTIR da gelatina de peixe (GPx), não reticulada e reticulada por DHT 72h, e por exposição ao vapor de soluções aquosas de GTA 50% 4 h e 5% 4h e 6h.

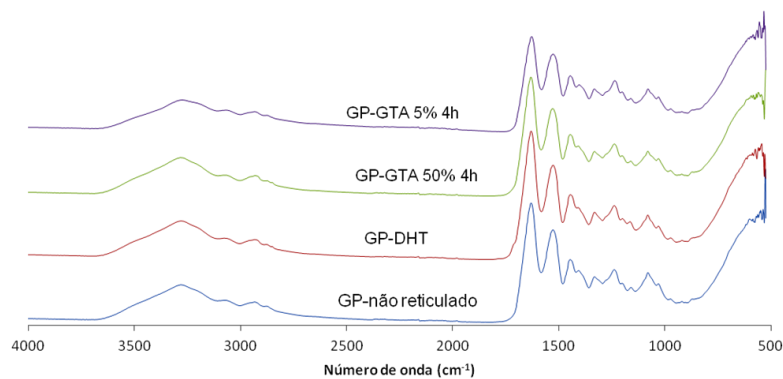


Figura 3.21- Espectros FTIR da gelatina de porco (GP), não reticulada e reticulada por DHT 72h, e por exposição ao vapor de soluções aquosas de GTA 50% 4 h e 5% 4h.

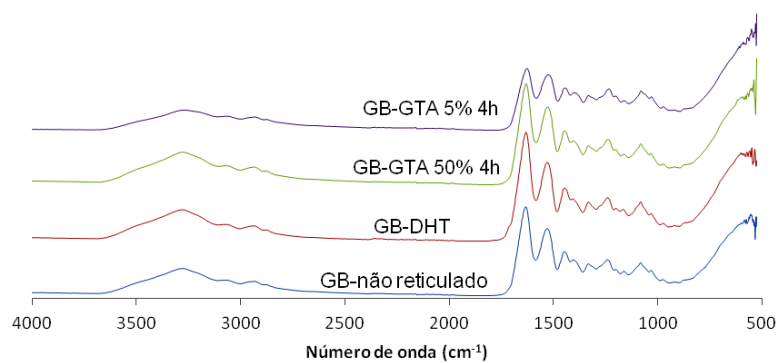


Figura 3.22- Espectros FTIR da gelatina de bovino (GB), não reticulada e reticulada por DHT 72h, e por exposição ao vapor de soluções aquosas de GTA 50% 4 h e 5% 4h.

3.3 Testes *in vitro*

Como referido anteriormente, os testes *in vitro* iniciaram-se com as células HFFF2 para uma primeira avaliação das taxas de adesão e proliferação destas células nos materiais produzidos. Posteriormente, procedeu-se à diferenciação das células SH-SY5Y em matrizes de fibras alinhadas, no sentido de averiguar qual a resposta de células neuronais a diferentes materiais.

3.3.1 Culturas com a linha celular HFFF2

Na primeira cultura celular foram avaliadas as viabilidades das células semeadas em matrizes de fibras desalinhas de CS, PCL e das gelatinas (GPx, GP e GB) reticuladas por DHT, recorrendo ao teste colorimétrico da resazurina. Usaram-se 5 réplicas de cada material na sementeira das células e 3 controlos de meio, efetuados na presença dos materiais (matrizes em meio). Foram ainda estabelecidos 3 controlos de células semeadas no fundo dos poços da placa de cultura (CC) e um controlo de meio nas mesmas condições. As células foram semeadas numa densidade 2×10^4 cél/ cm². Ao fim de 24h foi avaliada a viabilidade celular para inferir qual a taxa de adesão das células aos diferentes substratos relativamente ao CC. Na

Figura 3.23 estão representados graficamente os resultados obtidos.

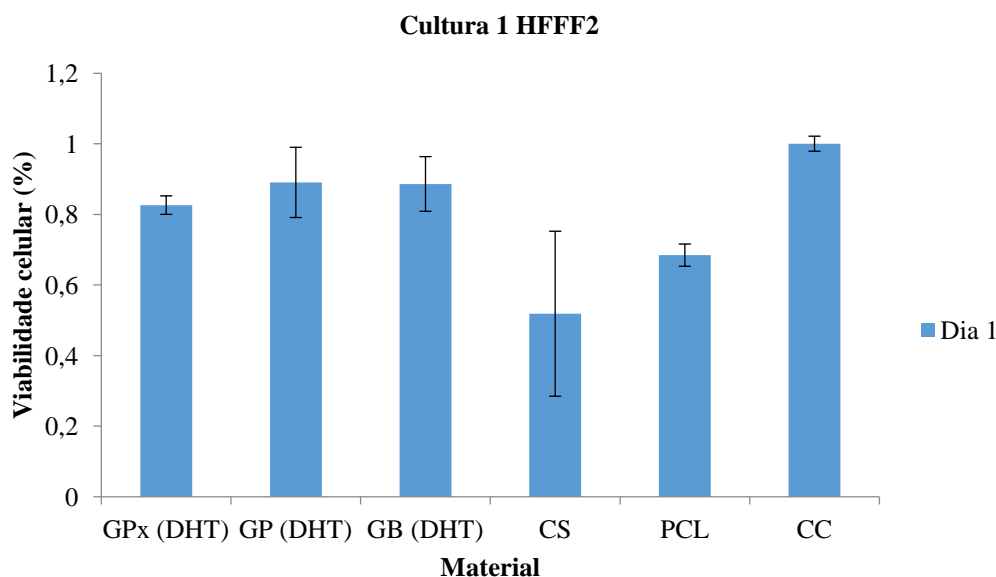


Figura 3.23- Representação da viabilidade das células HFFF2 às 24h, nas matrizes de CS, PCL e gelatinas reticuladas por DHT.

Estes resultados mostram que as células aderiram melhor às matrizes de gelatina, onde a viabilidade celular é próxima de 90 % relativamente ao CC. A adesão foi inferior no PCL e no CS, onde as células apresentam viabilidades relativas de 70% e 50 %, respetivamente. A melhor adesão celular à gelatina pode justificar-se pela presença de sequências RGD que beneficiem a adesão [7].

A viabilidade da população celular foi monitorizada em intervalos de dois dias, durante uma semana (Figura 3.24). Esta quase que duplicou a cada leitura efetuada, em todos os materiais exceto no CS. Ao 7º dia, a viabilidade celular no CS era 27% relativamente ao CC, enquanto na PCL atingia os 312%. Para a GPx, GP e GB esta tinha valores da ordem dos 264, 246 e 333 %, respetivamente. Noutros estudos efetuados por outros autores também se verificou uma baixa adesão e proliferação celulares em matrizes de CS [7].

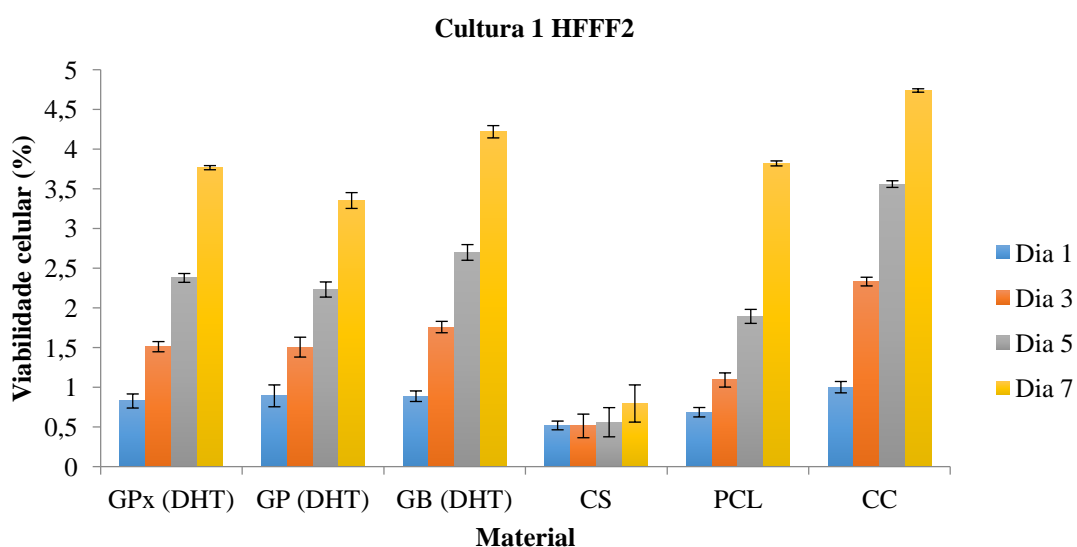


Figura 3.24- Representação da viabilidade das células HFFF2 semeadas em CS, PCL e gelatinas reticuladas por DHT, do 1º ao 7º dia de cultura (cultura 1).

De maneira a confirmar estes resultados e a avaliar a morfologia celular nos materiais, esta cultura foi repetida nas mesmas condições, mas o estudo prolongou-se por 11 dias. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.25.

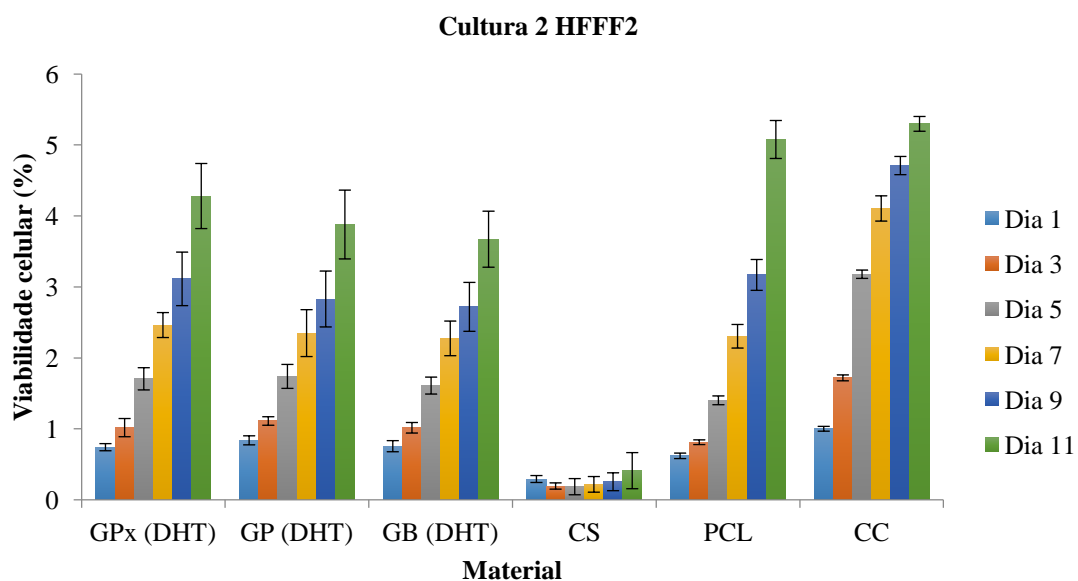


Figura 3.25- Representação da viabilidade das células HFFF2 semeadas em CS, PCL e gelatinas reticuladas por DHT, do 1º ao 11º dia (Cultura 2).

Em geral, os resultados da cultura 2 confirmam os da cultura 1. A baixa adesão e proliferação de células HFFF2 em matrizes de CS foi atribuída à não protonação dos grupos amina em meio de cultura. Não ficando estes grupos carregados positivamente, não haverá uma interação eletrostática com a membrana celular (carregada negativamente) favorável à adesão das células.

É de destacar que as taxas de proliferação celular ao 11º dia no PCL, na GPx, GP e GB são de 468, 354, 304 e 292 %, respetivamente. A partir do 7º dia é de notar o CC perto da confluência celular, dado que não cresce nas mesmas proporções.

As figuras 3.26, 3.27 e 3.28 mostram as imagens de fluorescência onde é possível observar a morfologia das células HFFF2 presentes nas matrizes.

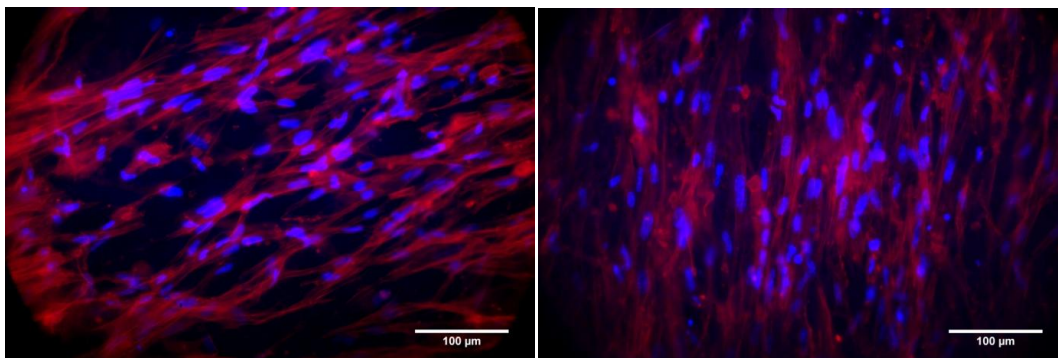


Figura 3.26- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas nas matrizes de GPx (à esquerda) e GP (à direita), ao 11º dia de cultura.

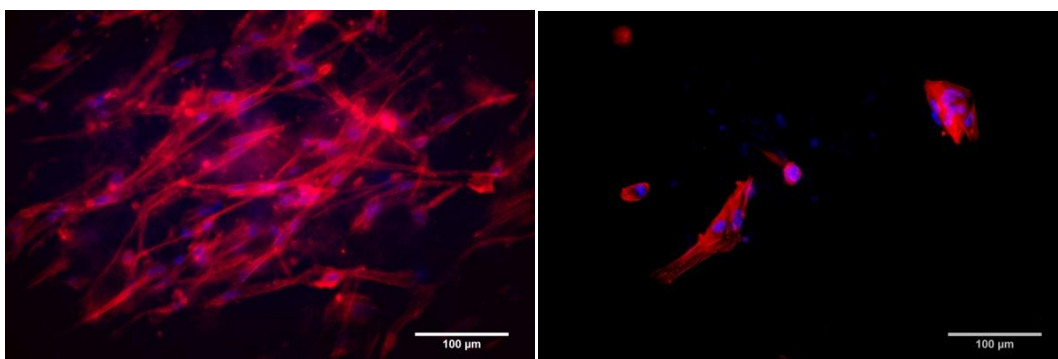


Figura 3.27- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas nas matrizes de GB (à esquerda) e CS (à direita), ao 11º dia de cultura.

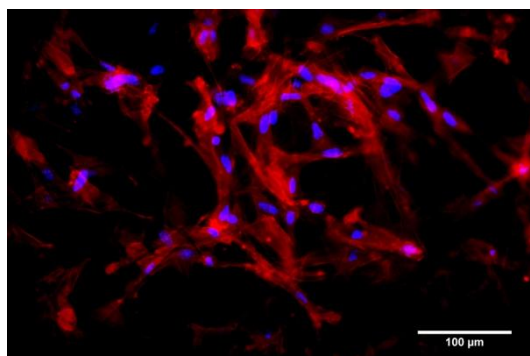


Figura 3.28- Imagem de fluorescência das células HFFF2, semeadas na matriz de PCL, ao 11º dia de cultura.

As imagens mostram células com uma forma alongada, típica dos fibroblastos HFFF2, em todas as matrizes, exceto no CS. Neste material as células apresentam-se mais esféricas, com a maioria da actina concentrada à volta do núcleo.

Na perspetiva de aumentar a adesão celular ao CS, procedeu-se à sua reticulação por DHT (72 h e 144 h) de modo a diminuir a sua hidrofilicidade e aumentar a quantidade de grupos

livres expostos que facilitem adesão celular. Estas culturas de células foram realizadas seguindo o mesmo procedimento das culturas anteriores. Os resultados apresentam-se na Figura 3.29.

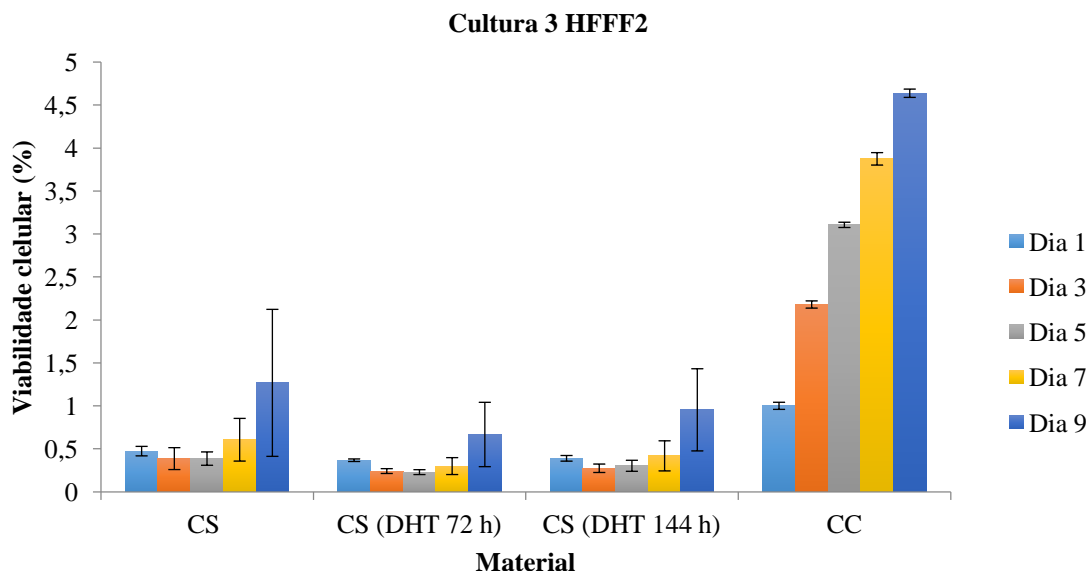


Figura 3.29- Representação da viabilidade das células HFFF2 semeadas em CS, CS reticulada por DHT 72 h e 144 h, do 1º ao 9º dia (Cultura 3).

Em todas as condições de cultura, as células aderiram às matrizes numa taxa relativamente baixa (36%), quando comparado com o CC na placa. Entre o 1º e 4º dia não ocorreu proliferação, verificando-se, pelo contrário, uma redução na viabilidade celular que só foi recuperada ao 7º dia. De uma maneira geral, a reticulação do quitosano não beneficiou as taxas de adesão e proliferação celular. Assim, nos passos seguintes deste trabalho, continuou-se a utilizar matrizes de CS não reticulado.

Relativamente à reticulação das matrizes de gelatina com GTA, inicialmente optou-se por expor as matrizes ao vapor de uma solução aquosa de GTA a 50% durante um período de 4h, devido às reduzidas perdas de massa demonstradas pelos materiais reticulados nestas condições. O passo seguinte foi comparar, *in vitro*, a resposta celular às matrizes de gelatina assim reticuladas e as reticulas por DHT. A comparação foi efetuada numa cultura de células da linha HFFF2. Os resultados estão apresentados na Figura 3.30.

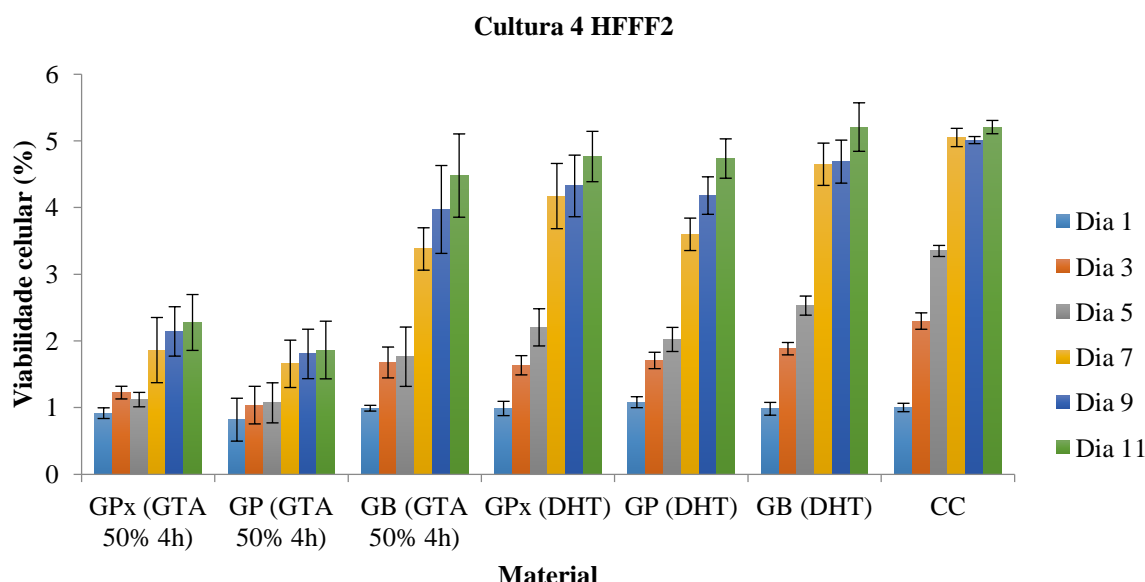


Figura 3.30- Representação da viabilidade das células HFFF2 nas matrizes de gelatinas, reticuladas por DHT e por exposição ao vapor de uma solução aquosa de GTA 50% durante 4h, do 1º ao 11º dia (Cultura 4).

Neste ensaio, as taxas de adesão celular de todas as gelatinas foram superiores a 82 %, aproximando-se do CC. É de salientar a existência de uma diferença de 20 % entre as taxas de adesão nas gelatinas de porco reticuladas por DHT e tratadas com GTA 50 % 4h.

Verifica-se que a viabilidade celular aumenta em todas as matrizes do 1º para o 3º dia de cultura, sendo notória a diferença entre as taxas de proliferação nas matrizes reticuladas por GTA e DHT (maior nas últimas). Entre o 5º e o 7º dia de cultura as viabilidades celulares nas gelatinas tratadas por DHT duplicaram e, o mesmo aconteceu na GB reticulada por GTA. É de realçar que ao 9º dia de cultura, todos os materiais reticulados por DHT se apresentam perto da confluência celular, sendo incontestável a sua citocompatibilidade, ao contrário das matrizes reticuladas com GTA, para as quais os resultados apontam para uma possível citotoxicidade. Este efeito é descrito frequentemente na literatura como devido à ação dos grupos aldeído não reagidos que causam a apoptose de algumas células [7, 71].

Com o intuito de reduzir este efeito, foi desenhado um plano de ação baseado na utilização de soluções aquosas de glicina (com diversas concentrações: 10, 50 mg/ml e 100 mg/ml) [87], que possam vir a reagir com os grupos aldeído não reagidos e assim bloquear a sua citotoxicidade. Após os processos de reticulação, as matrizes foram colocadas 48h no exsiccador e mergulhadas 24h nestas soluções, na estufa a 37°C. A Figura 3.31 apresenta os resultados da cultura efetuada nas matrizes tratadas.

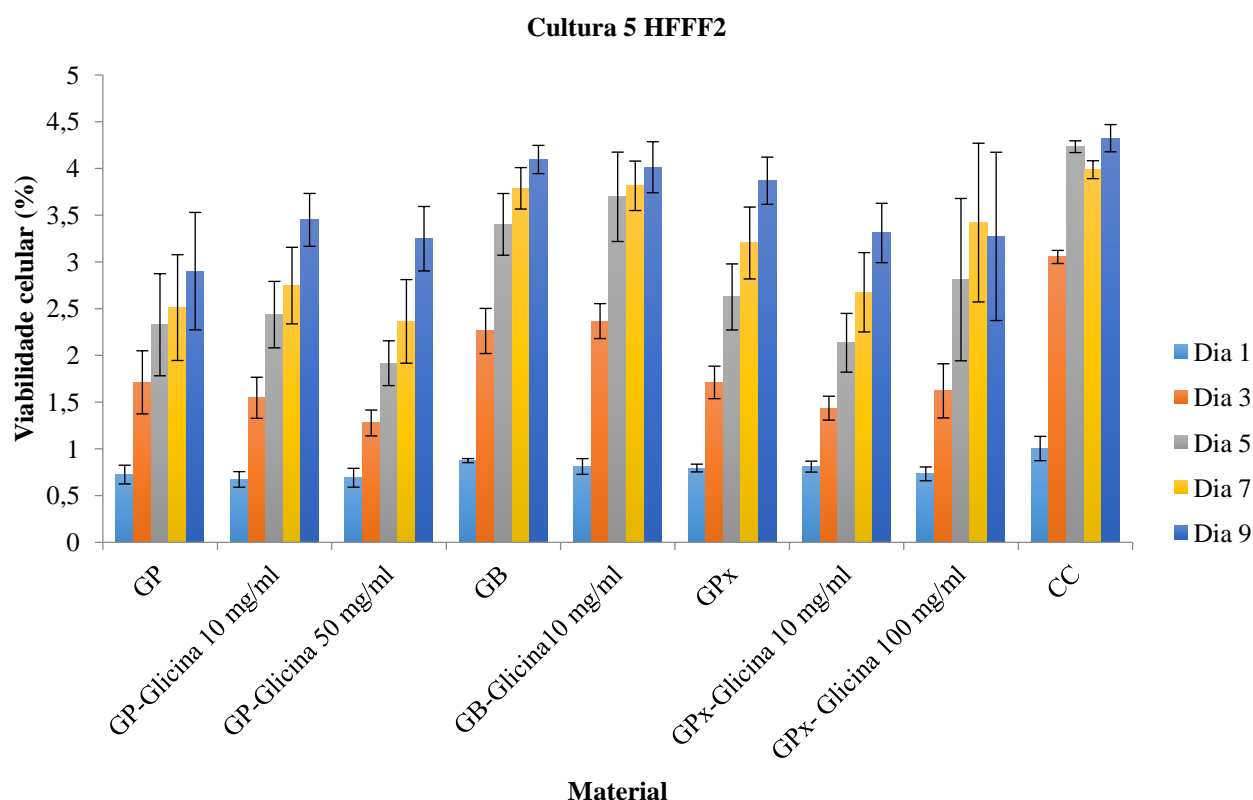


Figura 3.31- Representação da viabilidade celular das células HFFF2 semeadas nas matrizes de gelatinas reticuladas por GTA 50% 4h, tratadas com soluções de glicina (Cultura 5).

Os resultados obtidos não permitem concluir que a utilização das soluções de glicina possam reduzir a citotoxicidade associada ao tratamento com GTA, dado que nas matrizes reticuladas sem o tratamento com glicina, as taxas de adesão e de proliferação celular foram iguais ou superiores às pré-tratadas.

Testaram-se ainda outras possíveis formas de reduzir efeitos citotóxicos nas matrizes reticuladas com GTA, nomeadamente, por imersão das matrizes em soluções aquosas de gelatina (10 mg/ml) ou em água destilada, mas nenhuma destas hipóteses produziram resultados animadores.

Optou-se, então, por reduzir a concentração das soluções de GTA usadas na reticulação de 50% para 5%. Após os testes de perda de massa, foram definidas 4h e 6h como os tempos de exposição ao vapor desta solução. Iniciou-se um novo estudo comparativo (Figura 3.32), no qual se avaliou a adesão e proliferação das células HFFF2 quando semeadas nas gelatinas reticuladas usando soluções de GTA a 5% e a 50%. As matrizes foram mantidas em meio de cultura durante 24h, antes de efetuar a cultura. A viabilidade celular foi estimada até ao 11º dia de

cultura. Ao 3º dia realizou-se a fixação e marcação das células nas matrizes, de modo a avaliar a morfologia por microscopia ótica de fluorescência.

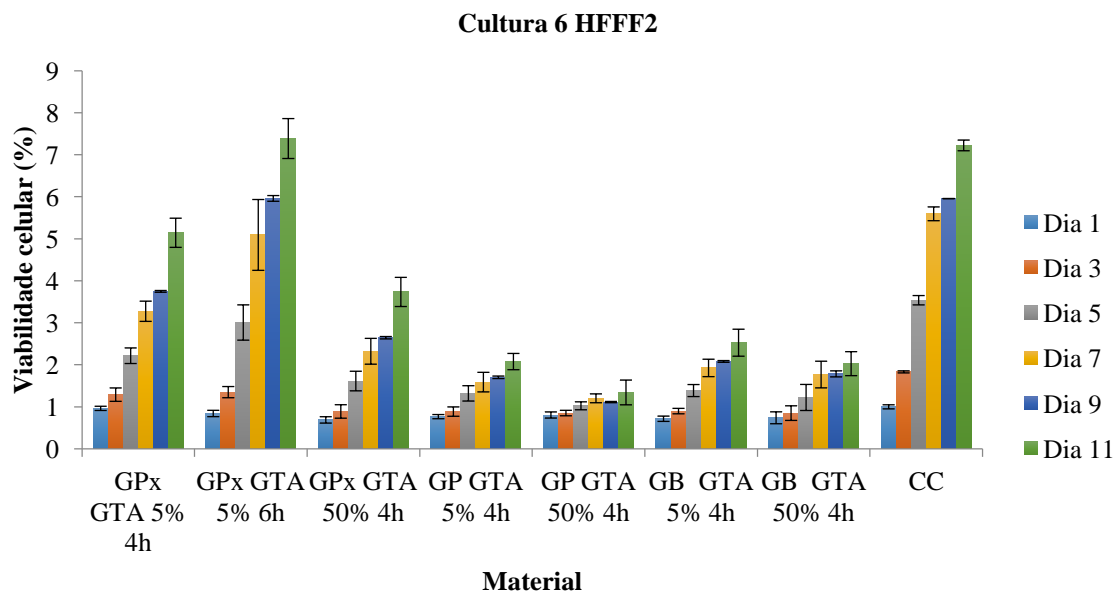


Figura 3.32- Representação da viabilidade das células HFFF2, semeadas nas matrizes de gelatinas reticuladas com GTA 5 e 50%, 4 e 6h (Cultura 6).

Os resultados presentes na Figura 3.32 indicam que para a GPx reticulada com GTA 5 % h e 6h, as taxas de adesão rondam os 95 e 85 %, respetivamente. Para a reticulação com GTA 50% 4h, a taxa de adesão situa-se nos 68 %. Neste material, o que se salienta não são as diferenças nas taxas de adesão celular, mas sim a dissimelhança das taxas de proliferação. As células têm mais dificuldade em proliferar nas matrizes reticuladas com as soluções de GTA 50% do que nas reticuladas com as soluções a 5%. O mesmo se evidencia para a GP e GB, mas de uma forma menos acentuada. As figuras 3.33, 3.34 e 3.35 mostram a morfologia alongada típica das células HFFF2.

Após estes tratamentos, nas matrizes reticuladas com GTA ainda surgem efeitos citotóxicos. Por esse motivo, na diferenciação das células SH-SY5Y só foram utilizados materiais reticulados por DHT.

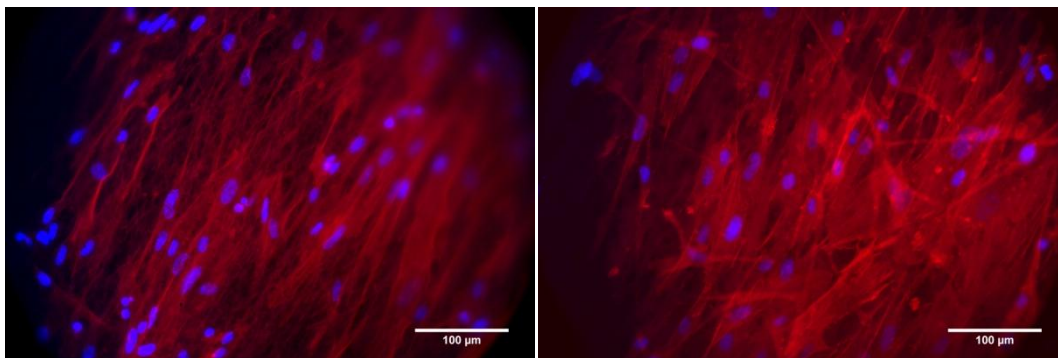


Figura 3.33- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas nas matrizes de GPx GTA 5% 4h (à esquerda) e GTA 5% 6h (à direita), ao 3º dia de cultura.

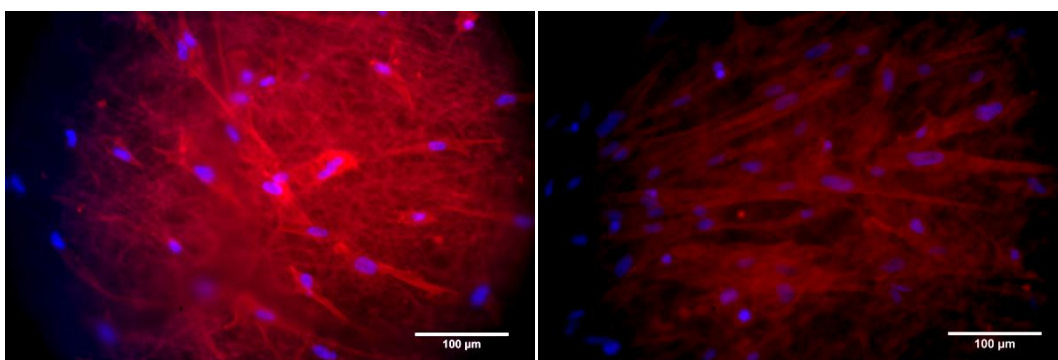


Figura 3.34- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas na matriz de GP GTA 50% 4h (à esquerda) e GB GTA 5% 4h (à direita), ao 3º dia de cultura.

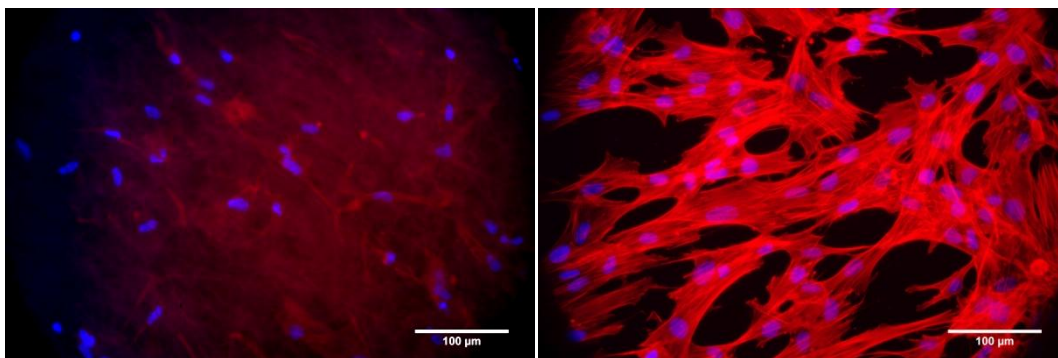


Figura 3.35- Imagens de fluorescência das células HFFF2, semeadas na matriz de GB GTA 50% 4h (à esquerda) e CC (à direita), ao 3º dia de cultura.

3.3.2 Culturas com a linha celular SH-SY5Y

Antes de se iniciar a diferenciação das células SH-SY5Y nas matrizes de fibras alinhadas, foi realizado um teste preliminar, de modo a otimizar o protocolo de diferenciação. Realizou-se uma sementeira com uma densidade celular de 20×10^3 cél/cm², semeadas no fundo do poço de uma placa com 24 poços, com DMEM a 10% de FBS. Ao longo dos dias foi se efetuando uma redução progressiva na percentagem de soro, com a consequente adição de 10 µM de AR. As condições de diferenciação (presentes no materiais e métodos) foram monitorizadas durante 13 dias, com mudança de meio de 48 em 48h.

As figuras 3.36 e 3.37 apresentam as imagens obtidas através de um microscópio ótico invertido, com os resultados do processo de diferenciação ao 13º dia de cultura.

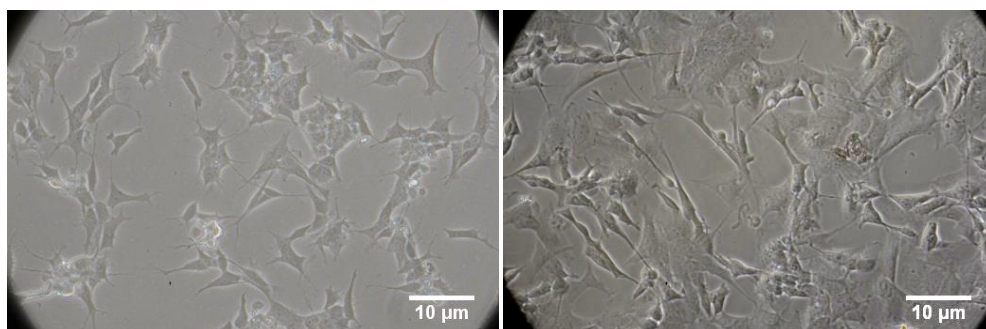


Figura 3.36- Resultados dos processos de diferenciação das células SH-SY5Y ao 13º dia de cultura. À esquerda representa-se a 1ª condição e à direita a 2ª condição.



Figura 3.37- Resultados do processo de diferenciação das células SH-SY5Y ao 13º dia, na 3ª condição.

Ao longo deste teste foi notória a extensão de neurites promovida pelo AR. Nas condições com 1% de soro (3ª e 4ª condição) evidenciou-se uma grande diminuição do número de células ao longo dos dias. Assim a condição 2 foi a preferida para a diferenciação das células SH-SY5Y na continuação do estudo.

O processo de diferenciação destas células nas matrizes alinhadas dos diferentes materiais decorreu durante 20 dias. Foram fixadas 2 réplicas de cada material e do CC em lamelas de vidro ao 10º, 15º e 20º dias de cultura através dos procedimentos já mencionados. As figuras 3.38 a 3.41 mostram os resultados obtidos.

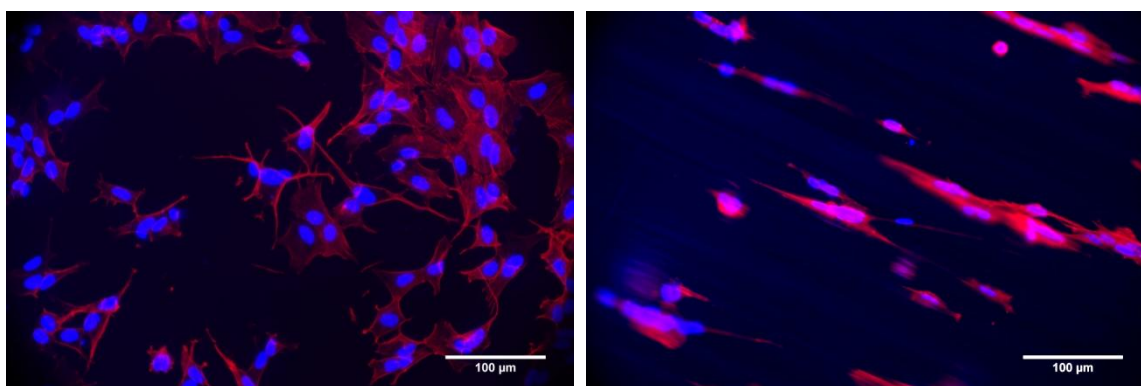


Figura 3.39- Imagens de fluorescência das células SH-SY5Y ao 10º dia de cultura. À esquerda está presente o CC e à direita o PCL com fibras alinhadas.

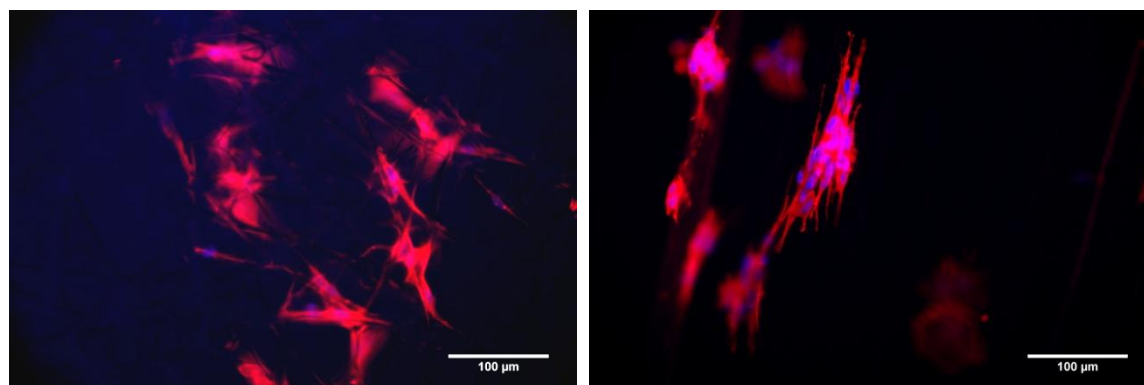


Figura 3.38- Imagens de fluorescência das células SH-SY5Y ao 10º dia de cultura. À esquerda está presente a PCL com fibras desalinhadas e à direita a GPx com fibras alinhadas (DHT).

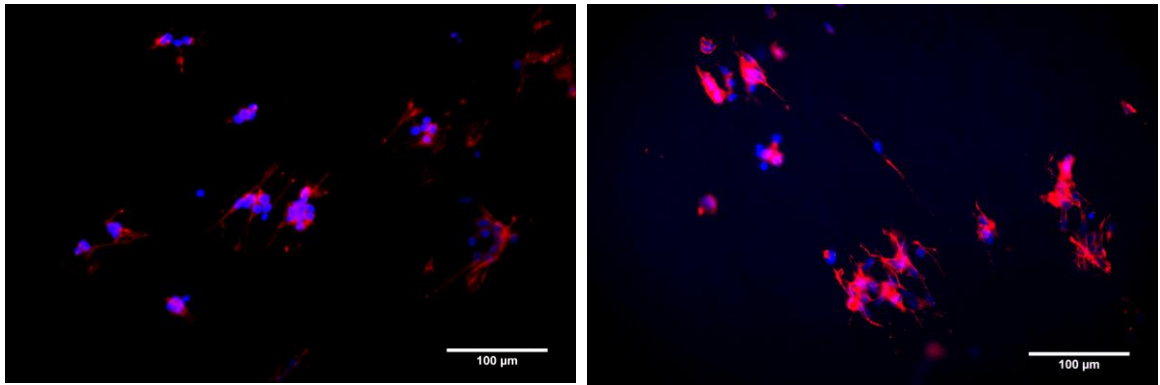


Figura 3.40- Imagem de fluorescência das células SH-SY5Y ao 10º dia de cultura. À esquerda está presente a GP com fibras alinhadas (DHT) e à direita a GB com fibras alinhadas (DHT).

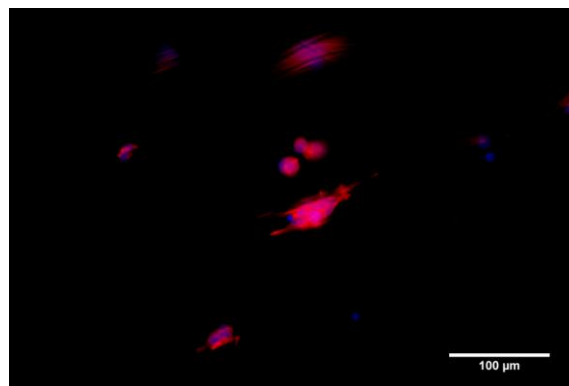


Figura 3.41- Imagem de fluorescência das células SH-SY5Y ao 10º dia de diferenciação no CS.

Através das imagens após 10 dias em cultura é possível identificar algumas neurites com tamanhos variáveis, seguindo o alinhamento preferencial das fibras das matrizes. Nas matrizes de gelatinas foi particularmente difícil esta avaliação devido à sua autofluorescência.

O AR controla os processos de diferenciação celular através da modulação da expressão de genes que respondem à sua presença [88]. De acordo com a literatura o AR inibe a taxa a crescimento celular durante os primeiros 8-10 dias de tratamento, aumentando progressivamente o número de células diferenciadas.

Devido a uma falha na marcação dos citoesqueletos, não foi possível obter imagens ao 15º e 20º dias de cultura, exceto no PCL (Figura 3.42), onde se verifica a continuidade dos alongamento das neurites na direção preferencial das fibras.

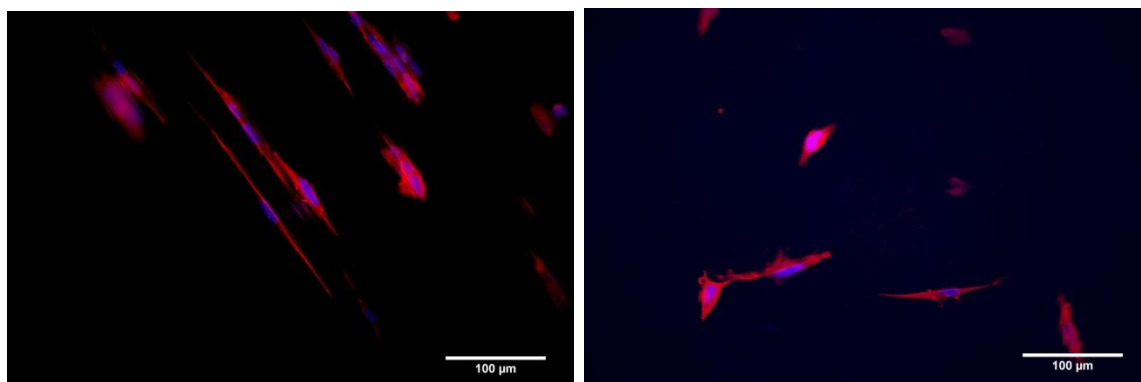


Figura 3.42- Imagens de fluorescência das células SH-SY5Y ao 20º dia de diferenciação no PCL com fibras alinhadas (à esquerda) e no PCL com fibras desalinhadas (à direita).

4 Conclusões e perspectivas futuras

O presente tema de dissertação insere-se na área de Engenharia de tecidos. Teve como principal objetivo a produção de matrizes de fibras por electrofiação a partir das soluções poliméricas de CS, GPx, GP, GB e PCL. Posteriormente avaliou-se *in vitro* a resposta celular às matrizes fibrosas dos diferentes materiais, através de estudos de adesão e proliferação de fibroblastos, bem como se analisou a morfologia de células neuronais diferenciadas nas matrizes.

Tudo começou com a otimização dos parâmetros de produção das matrizes no processo de electrofiação. Após concluída esta etapa, iniciou-se a produção de fibras poliméricas alinhadas num coletor rotatório. Nesta fase, para as soluções de gelatina foi necessário proceder a um reajuste nos parâmetros do processo. Foram assim obtidas fibras com diâmetro variável (exceto no caso do CS), morfologia uniforme, sem contas nem pontos de fusão. De um ponto de vista geral, as matrizes de PCL foram as mais fáceis de alinhar devido à baixa condutividade das soluções precursoras.

Dadas as propriedades de dissolução das matrizes de gelatina, antes de serem submetidas a testes, foram reticuladas pelo processo de DHT e por exposição a vapor de GTA.

Ao iniciar os ensaios *in vitro* com todos os materiais nas células HFFF2, as matrizes de gelatina tratadas com GTA revelaram alguma citotoxicidade devido à presença de grupos aldeídos não reagidos. Embora as células semeadas nestas matrizes apresentassem uma taxa de adesão próxima do CC, a sua taxa de proliferação fica aquém dos valores observados para o mesmo material quando reticulado por DHT. Mesmo diminuindo a concentração de GTA na solução utilizada no tratamento, o efeito perdurou. Apesar de durante o estudo terem sido aplicadas diversas táticas para diminuir a citotoxicidade que envolveram a colocação das matrizes em soluções de glicina, gelatina e água, o seu sucesso foi limitado e não foi possível estabelecer condições que garantam a sua eliminação. Para além do potencial efeito tóxico do GTA é ainda necessário assegurar que nas matrizes não perdurem resíduos ácidos do solvente usado nas soluções. Futuramente propõe-se que alguns procedimentos já efetuados durante este trabalho sejam otimizados por forma a estabelecer um protocolo fiável. Estes procedimentos incluem deixar as amostras por longos períodos no exsiccador e/ ou colocá-las numa estufa a temperaturas que rondem os 100°C (para eliminação de resíduos tóxicos voláteis), ou utilizar um tratamento que resulte na reação dos grupos aldeído não reagidos durante o processo de reticulação.

No caso das gelatinas reticuladas por DHT, estas demonstraram excelentes capacidades de adesão e proliferação celular; em contrapartida a sua elevada perda de massa e rápida degradação enzimática (não testada neste trabalho) constitui uma limitação à sua utilização durante um longo prazo.

O quitosano revelou-se um polímero com baixa adesão celular e consequente proliferação, possivelmente oriunda da desprotonação dos grupos amina em meio de cultura. Mesmo quando reticulado por DHT, não se evidenciaram vantagens adicionais (Cultura 3).

Na PCL obtiveram-se elevadas taxas de adesão e proliferação celular, muito semelhantes às observadas nas matrizes de gelatina reticuladas por DHT. De todos os materiais estudados, é o que se destaca com melhores propriedades mecânicas (baixo módulo de *Young* e elevada elasticidade) para aplicação em engenharia de tecidos moles tais como o tecido neuronal.

Relativamente ao protocolo estabelecido para a diferenciação da linha celular SH-SY5Y, este conduziu a alterações morfológicas e ao aparecimento de prolongamentos do tipo extensões neuríticas características de neurónios. Com o início da diferenciação celular nas matrizes alinhadas de gelatinas (reticuladas por DHT), CS e PCL, observou-se através de microscopia de fluorescência, o prolongamento das extensões neuríticas ao longo das fibras, comprovando que a topografia das matrizes poderá influenciar positivamente a regeneração axonal promovendo e guiando o crescimento destas extensões. Futuramente propõe-se o estudo da avaliação do comprimento das neurites, de modo a aferir qual o material que melhor influencia o seu crescimento; o ajuste na densidade e nas condições das sementeiras poderá revelar-se relevante. Por fim, seria importante a avaliação da resposta de células neuronais aos materiais, células essas mais próximas de neurónios funcionais, que possam vir a ser transplantadas para o corpo humano.

Referências

1. Tortora, G.J. and B.H. Derrickson, *Principles of anatomy and physiology*. 2008: John Wiley & Sons.
2. Silva, N.A., et al., *From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury*. Progress in neurobiology, 2014. **114**: p. 25-57.
3. Mothe, A.J. and C.H. Tator, *Review of transplantation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury*. International Journal of Developmental Neuroscience, 2013. **31**(7): p. 701-713.
4. Friedman, M., *Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences*. Journal of agricultural and food chemistry, 2004. **52**(3): p. 385-406.
5. Azami, M., F. Moztaezadeh, and M. Tahriri, *Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting combined with freeze-drying and lamination techniques*. Journal of Porous Materials, 2010. **17**(3): p. 313-320.
6. Wang, G., et al., *The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells*. Acta biomaterialia, 2010. **6**(9): p. 3630-3639.
7. Gomes, S.R., et al., *In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study*. Materials Science and Engineering C, 2015. **46**: p. 348-358.
8. S., S.R., *Clinical neuroanatomy*. 7 ed. 2010, China: Lippincott Williams & Wilkins.
9. Boron, W.F. and E.L. Boulpaep, *Medical Physiology: a cellular and molecular approach*. 2 ed. 2012, United States: Saunders. 267-323.
10. Wang, M., et al., *Bioengineered scaffolds for spinal cord repair*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2011. **17**(3): p. 177-194.
11. Schmidt, C.E. and J.B. Leach, *Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration*. Annual review of biomedical engineering, 2003. **5**(1): p. 293-347.
12. Liverman, C.T., et al., *Spinal cord injury: progress, promise, and priorities*. 2005: National Academies Press.
13. Haugh, M.G., M.J. Jaasma, and F.J. O'Brien, *The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds*. Journal of biomedical materials research Part A, 2009. **89**(2): p. 363-369.
14. Compagnone, N.A., *Treatments for spinal cord injury: Is there hope in neurosteroids?* The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2008. **109**(3): p. 307-313.
15. Ragnarsson, K., *Functional electrical stimulation after spinal cord injury: current use, therapeutic effects and future directions*. Spinal cord, 2008. **46**(4): p. 255-274.
16. Tabesh, H., et al., *The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration*. Neurochemistry international, 2009. **54**(2): p. 73-83.

17. Cao, H., T. Liu, and S.Y. Chew, *The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering*. Advanced drug delivery reviews, 2009. **61**(12): p. 1055-1064.
18. Jiang, X., et al., *Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits*. Experimental neurology, 2010. **223**(1): p. 86-101.
19. Wang, S. and L. Cai, *Polymers for fabricating nerve conduits*. International Journal of Polymer Science, 2010. **2010**.
20. de Ruiter, G.C., et al., *Designing ideal conduits for peripheral nerve repair*. Neurosurgical focus, 2009. **26**(2): p. E5.
21. Nomura, H., C.H. Tator, and M.S. Shoichet, *Bioengineered strategies for spinal cord repair*. Journal of neurotrauma, 2006. **23**(3-4): p. 496-507.
22. Novikova, L.N., L.N. Novikov, and J.-O. Kellerth, *Biopolymers and biodegradable smart implants for tissue regeneration after spinal cord injury*. Current opinion in neurology, 2003. **16**(6): p. 711-715.
23. Wong, D.Y., et al., *Macro-architectures in spinal cord scaffold implants influence regeneration*. Journal of neurotrauma, 2008. **25**(8): p. 1027-1037.
24. Gelain, F., et al., *Transplantation of nanostructured composite scaffolds results in the regeneration of chronically injured spinal cords*. ACS nano, 2010. **5**(1): p. 227-236.
25. Novikov, L.N., et al., *A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury*. Biomaterials, 2002. **23**(16): p. 3369-3376.
26. Chow, W.N., et al., *Evaluating neuronal and glial growth on electrospun polarized matrices: bridging the gap in percussive spinal cord injuries*. Neuron glia biology, 2007. **3**(02): p. 119-126.
27. Kim, Y.-t., et al., *The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps*. Biomaterials, 2008. **29**(21): p. 3117-3127.
28. Xie, J., et al., *The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages*. Biomaterials, 2009. **30**(3): p. 354-362.
29. Han, Q., et al., *Linear ordered collagen scaffolds loaded with collagen-binding brain-derived neurotrophic factor improve the recovery of spinal cord injury in rats*. Tissue Engineering Part A, 2009. **15**(10): p. 2927-2935.
30. Cheng, H., et al., *Laminin-incorporated nerve conduits made by plasma treatment for repairing spinal cord injury*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **357**(4): p. 938-944.
31. Zeng, X., et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells in a three-dimensional gelatin sponge scaffold attenuate inflammation, promote angiogenesis, and reduce cavity formation in experimental spinal cord injury*. Cell Transplantation, 2011. **20**(11-12): p. 1881-1899.
32. Du, B.L., et al., *Graft of the gelatin sponge scaffold containing genetically-modified neural stem cells promotes cell differentiation, axon regeneration, and functional recovery in rat with spinal cord transection*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015. **103**(4): p. 1533-1545.
33. Jansen, K., et al., *A hyaluronan-based nerve guide: in vitro cytotoxicity, subcutaneous tissue reactions, and degradation in the rat*. Biomaterials, 2004. **25**(3): p. 483-489.
34. Yi, X., et al., *Porous chitosan scaffold and ngf promote neuronal differentiation of neural stem cells in vitro*. Neuro endocrinology letters, 2010. **32**(5): p. 705-710.

35. Nomura, H., et al., *Extramedullary chitosan channels promote survival of transplanted neural stem and progenitor cells and create a tissue bridge after complete spinal cord transection*. Tissue Engineering Part A, 2008. **14**(5): p. 649-665.
36. Li, X., et al., *Repair of thoracic spinal cord injury by chitosan tube implantation in adult rats*. Biomaterials, 2009. **30**(6): p. 1121-1132.
37. Zhang, Y., et al., *Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2005. **72**(1): p. 156-165.
38. Ghasemi-Mobarakeh, L., et al., *Electrospun poly (ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(34): p. 4532-4539.
39. Chew, S.Y., et al., *Aligned Protein-Polymer Composite Fibers Enhance Nerve Regeneration: A Potential Tissue-Engineering Platform*. Advanced functional materials, 2007. **17**(8): p. 1288-1296.
40. Songchotikunpan, P., J. Tattiyakul, and P. Supaphol, *Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin*. International Journal of Biological Macromolecules, 2008. **42**: p. 247-255.
41. Karim, A.A. and R. Bhat, *Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins*. Food Hydrocolloids, 2009. **23**: p. 563-576.
42. Siqueira, N.M., et al., *Gelatin and galactomannan-based scaffolds: Characterization and potential for tissue engineering applications*. Carbohydrate Polymers, 2015. **133**: p. 8-18.
43. Gómez-Guillén, M.C., et al., *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**: p. 1813-1827.
44. Gómez-Guillén, M., et al., *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(8): p. 1813-1827.
45. Young, S., et al., *Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules*. Journal of Controlled Release, 2005. **109**: p. 256- 274.
46. Azilawati, M., et al., *RP-HPLC method using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate incorporated with normalization technique in principal component analysis to differentiate the bovine, porcine and fish gelatins*. Food chemistry, 2015. **172**: p. 368-376.
47. Pillai, C., W. Paul, and C.P. Sharma, *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*. Progress in polymer science, 2009. **34**(7): p. 641-678.
48. Dash, M., et al., *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. Progress in polymer science, 2011. **36**(8): p. 981-1014.
49. Choi, C., J.-P. Nam, and J.-W. Nah, *Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2016. **33**: p. 1-10.
50. Khor, E. and L.Y. Lim, *Implantable applications of chitin and chitosan*. Biomaterials, 2003. **24**(13): p. 2339-2349.
51. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: properties and applications*. Progress in polymer science, 2006. **31**(7): p. 603-632.
52. Singla, A. and M. Chawla, *Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects-an update*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001. **53**(8): p. 1047-1067.

53. Kapil, R., D.N. Kapoor, and S. Dhawan, *Flow, compressive, and bioadhesive properties of various blends of poly (ethylene oxide)*. Drug development and industrial pharmacy, 2010. **36**(1): p. 45-55.
54. Dhawan, S., M. Varma, and V. Sinha, *High Molecular Weight Poly (ethylene oxide)–Based Drug Delivery Systems*. Pharm Technol, 2005. **29**(5): p. 72-80.
55. Kiss, D., K. Süvegh, and R. Zelkó, *The effect of storage and active ingredient properties on the drug release profile of poly (ethylene oxide) matrix tablets*. Carbohydrate Polymers, 2008. **74**(4): p. 930-933.
56. Ferreira, J.L., et al., *Electrospinning Polycaprolactone Dissolved in Glacial Acetic Acid: Fiber Production, Nonwoven Characterization, and In Vitro Evaluation*. Journal of Applied Polymer Science, 2014. **131**: p. 1-9.
57. Nair, L.S. and C.T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in polymer science, 2007. **32**: p. 762-798.
58. Estellés, J.M., et al., *Physical characterization of polycaprolactone scaffolds*. Materials in Medicine, 2008. **19**: p. 189–195.
59. Pok, S.W., K.N. Wallace, and S.V. Madihally, *In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**: p. 1061–1068.
60. Ghasemi-Mobarakeh, L., et al., *Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*. Materials Science and Engineering: C, 2010. **30**(8): p. 1129-1136.
61. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology advances, 2010. **28**(3): p. 325-347.
62. Okutan, N., P. Terzi, and F. Altay, *Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers*. Food Hydrocolloids, 2014. **39**: p. 19-26.
63. Subbiah, T., et al., *Electrospinning of nanofibers*. Journal of Applied Polymer Science, 2005. **96**(2): p. 557-569.
64. Sill, T.J. and H.A. von Recum, *Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(13): p. 1989-2006.
65. Pulieri, E., et al., *Chitosan/gelatin blends for biomedical applications*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008. **86**(2): p. 311-322.
66. Ge, L., et al., *Short-range and long-range cross-linking effects of polygenipin on gelatin-based composite materials*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2016.
67. Gomes, S., et al., *In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds*. Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(3): p. 1219-1227.
68. Sisson, K., et al., *Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability*. Biomacromolecules, 2009. **10**(7): p. 1675-1680.
69. Catalina, M., et al., *Influence of crosslinkers and crosslinking method on the properties of gelatin films extracted from leather solid waste*. Journal of Applied Polymer Science, 2011. **119**(4): p. 2105-2111.
70. Ma, B., et al., *Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds*. Regenerative biomaterials, 2014. **1**(1): p. 81-89.

71. Zhang, Y., et al., *Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers*. Polymer, 2006. **47**(8): p. 2911-2917.
72. Yao, C.-H., et al., *Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials*. Materials Chemistry and Physics, 2004. **83**(2): p. 204-208.
73. Sun, S.-W., et al., *Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification*. Journal of food composition and analysis, 2006. **19**(2): p. 112-117.
74. Schneider, L., et al., *Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress*. Free Radical Biology and Medicine, 2011. **51**(11): p. 2007-2017.
75. Jämsä, A., et al., *The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation*. Biochemical and biophysical research communications, 2004. **319**(3): p. 993-1000.
76. Encinas, M., et al., *Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells*. Journal of neurochemistry, 2000. **75**(3): p. 991-1003.
77. Dwane, S., E. Durack, and P.A. Kiely, *Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration*. BMC research notes, 2013. **6**(1): p. 1.
78. Cheung, Y.-T., et al., *Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research*. Neurotoxicology, 2009. **30**(1): p. 127-135.
79. Agholme, L., et al., *An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons*. Journal of Alzheimer's Disease, 2010. **20**(4): p. 1069-1082.
80. Drexler, J.W. and H.M. Powell, *Dehydrothermal crosslinking of electrospun collagen*. Tissue Engineering Part C: Methods, 2010. **17**(1): p. 9-17.
81. Ratanavaraporn, J., et al., *Comparison of gelatin and collagen scaffolds for fibroblast cell culture*. Journal of Metals, Materials and Minerals, 2006. **16**(1): p. 31-36.
82. Balau, L., et al., *Physico-chemical properties of chitosan films*. Central European Journal of Chemistry, 2004. **2**(4): p. 638-647.
83. Kriegel, C., et al., *Electrospinning of chitosan-poly (ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions*. Polymer, 2009. **50**(1): p. 189-200.
84. Nguyen, T.-H. and B.-T. Lee, *Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers*. Journal of Biomedical Science and Engineering, 2010. **3**(12): p. 1117.
85. Kong, J. and S. Yu, *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures*. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2007. **39**(8): p. 549-559.
86. Yodkhum, K. and T. Phaechamud, *Hydrophobic chitosan sponges modified by aluminum monostearate and dehydrothermal treatment as sustained drug delivery system*. Materials Science and Engineering: C, 2014. **42**: p. 715-725.
87. Bigi, A., et al., *Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking*. Biomaterials, 2001. **22**(8): p. 763-768.

88. Lopes, F.M., et al., *Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies*. Brain research, 2010. **1337**: p. 85-94.

Anexos

Anexo 1- Composição dos aminoácidos da gelatina de porco, bovino, peixe

Tabela A. 1- Composição dos aminoácidos da gelatina de porco, bovino, peixe [46].

Aminoácidos	Média e desvio padrão (10 amostras) (%(m/m))			Diferença entre os resultados (%)		
	Porco	Bovino	Peixe	Bovino e porco	Bovino e Peixe	Porco e Peixe
Hidroxiprolina	10,91 ± 0,61	10,85 ± 0,54	7,01 ± 0,37	0,06	3,84	3,90
Ácido Aspártico	5,47 ± 0,33	4,92±0,39	7,01 ± 0,37	0,55	0,63	0,08
Serina	4,27 ± 0,20	3,98±0,16	6,91 ± 0,23	0,29	2,93	2,64
Ácido Glutâmico	9,67 ± 0,58	9,26 ± 0,58	9,23 ± 0,53	0,41	0,03	0,44
Glicina	21,64 ± 2,70	23,05±1,33	22,37 ± 2,28	1,41	0,68	0,73
Arginina	8,67 ± 0,47	8,80±0,52	9,23 ± 0,45	0,14	0,43	0,57
Treonina	2,18 ± 0,15	2,34±0,12	3,18 ± 0,15	0,16	0,84	1,00
Alanina	8,05 ± 0,76	8,37 ± 0,73	8,43 ± 0,73	0,32	0,06	0,37
Prolina	11,21 ± 0,56	11,75 ± 0,53	9,58 ± 0,38	0,54	2,18	1,64
Tirosina	1,01 ± 0,07	0,63 ± 0,04	0,72 ± 0,05	0,38	0,09	0,29
Valina	2,33 ± 0,09	2,47 ± 0,32	2,05 ± 0,05	0,14	0,42	0,28
Metionina	1,51 ± 0,13	1,12 ± 0,20	2,64 ± 0,11	0,39	1,51	1,12
Lisina	3,78 ± 0,19	3,25 ± 0,27	3,38 ± 0,27	0,53	0,13	0,41
Isoleucina	1,56 ± 0,06	1,63 ± 0,13	1,26 ± 0,04	0,07	0,37	0,30
Leucina	3,10 ± 0,09	3,10 ± 0,12	2,50 ± 0,06	0,00	0,59	0,60
Fenilalanina	2,22 ± 0,15	2,38 ± 0,15	2,31 ± 0,10	0,17	0,08	0,09

Anexo 2-Ensaio de ninidrina

Preparação das soluções de gelatina:

- 1) Preparar solução de gelatina de 5 mg/ml, dissolvida em água ultra-pura;
- 2) Dissolver a solução stock de gelatina em com água ultra pura, nas concentrações de 4, 3, 2, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5 mg/ml;
- 3) Preparou-se uma solução tampão de acetato de sódio 4M. Dissolveu-se 12,06g de $C_2H_3NaO_2$ em 30 ml de água ultra-pura.

Preparação da solução tampão de acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2$) 4M:

- 4) Pesar 12,06 mg de $C_2H_3NaO_2$ e adicionar a 30 ml de água ultra-pura;
- 5) Ajustar pH da solução para 5,2 com ácido clorídrico;
- 6) Perfazer o volume até 50 ml.

Preparação da solução de ninidrina:

- 1) Dissolver 0,6 g de ninidrina e 0,09 g de hidradantina (Sigma-Aldrich®) em 22,5 ml de DMSO;
- 2) Completar solução com 7,5 ml de solução tampão.

Solução estabilizadora: Preparar solução aquosa de 50% de etanol.

Ensaio:

- 1) Adicionar 1 ml de solução de gelatina a 1 ml de solução de ninidrina e agitar no vortéx;
- 2) Colocar frascos na estufa entre 80-95°C, deixar reagir durante 60 minutos;
- 3) Arrefecer os frascos num banho de água fria;
- 4) Adicionar 2ml de solução estabilizadora;
- 5) Homogeneizar no vortéx;
- 6) Medir absorvância de 100 µl a 570 nm.

Anexo 3-Culturas celulares

A. Protocolo de esterilização de amostras

- 1) Retirar poços de teflon do etanol a 70% (v/v);
- 2) Colocar as amostras dentro dos tubos na placa esterilizada;
- 3) Colocar etanol a 70% (v/v) em cada tubo e deixar atuar durante cerca de 10 minutos;
- 4) Lavar duas vezes com água estéril;
- 5) Lavar duas vezes com PBS;
- 6) Colocar 250 µl de DMEM.

B. Protocolo de tripsinização

- 1) Remover meio do T25 sem tocar na camada de células;
- 2) Lavar células com 5 ml PBS⁻;
- 3) Pipetar 500 µl de tripsina para o T25;
- 4) Colocar o T25 a incubar a 37°C durante 5 minutos;
- 5) Verificar se as células se encontram em suspensão através do microscópio invertida (Nikon Eclipse Ti-S);
- 6) Adicionar 5 ml de DMEM ao T25;
- 7) Transferir suspensão de células para um tubo de *falcon* e resuspender.

C. Protocolo de contagem de células

- 1) Preparar o hemocitómetro;
- 2) Pipetar 100 µl da suspensão de células acabada de suspender para um microtubo;
- 3) Adicionar 100 µl de azul tripano e voltar a suspender;
- 4) Preencher as câmaras do hemocitómetro com suspensão celular;
- 5) Observar no microscópio invertido a grelha do hemocitómetro e proceder à contagem de células viáveis;
- 6) Calcular a concentração celular (células/ml) através da equação seguinte:

$$\text{Concentração celular} = \frac{\text{Total de células viáveis}}{\text{nº de quadrados contados com 1mm de lado}} \times 2 \times 10\,000$$

D. Fixação celular

- 1) Lavar as amostras com PBS⁺⁺;
- 2) Colocar 250 µl de paraformaldeído (PFA) a 3,7% em cada tubo de teflon e deixar por 15 minutos;
- 3) Aspirar o PFA e lavar 2x com PBS⁺⁺;
- 4) Lavar com água ultrapura;

E. Marcação dos citoesqueletos

- 1) Permeabilizar as células com Triton X-100 a 0,2% e deixar atuar por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 2) Lavar amostras com PBS;
- 3) Aplicar 200 µl de solução a 100 nM do Acti-stainTM 555 *phalloidin* e incubar protegido da luz, em câmara húmida à temperatura ambiente por 30 minutos;
- 4) Lavar 3 vezes com PBS;

F. Marcação dos núcleos

- 1) Adicionar 50 µl de solução de DAPI a 300 nM e incubar à temperatura ambiente por 2-5 minutos, em câmara húmida;
- 2) Lavar 3 vezes as amostras com PBS;